



Universidade Nova de Lisboa

Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**IDENTIFICAÇÃO DE NEGEVÍRUS EM MOSQUITOS
COLHIDOS NO SUL DE PORTUGAL E ANÁLISE DA SUA
REPLICAÇÃO**

Sara Sofia Costa Carapeta

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS
BIOMÉDICAS ESPECIALIDADE EM BIOLOGIA MOLECULAR EM SAÚDE TROPICAL E
INTERNACIONAL**

JANEIRO, 2015



Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**IDENTIFICAÇÃO DE NEGEVÍRUS EM MOSQUITOS
COLHIDOS NO SUL DE PORTUGAL E ANÁLISE DA SUA
REPLICAÇÃO**

Autor: Sara Sofia Costa Carapeta

Orientador: Professor Doutor Ricardo Parreira

Coorientador: Professor Doutor Paulo Almeida

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas.

A presente dissertação foi redigida de acordo com o novo acordo ortográfico.

Elementos Bibliográficos Resultantes da Dissertação

Os resultados apresentados nesta dissertação foram objetivo de submissão em coautoria da seguinte comunicação sob a forma de artigo submetido para publicação:

Carapeta, S., do Bem, B., Mc Guinness, J., Esteves, A., Abecasis, A., Lopes, Â., de Matos, A.P., Piedade, J., Almeida, A.P.G. and Parreira, R. Negev-like viruses found in multiple species of mosquitoes from southern Portugal: isolation, genetic diversity, and replication in insect cell culture. Submetido à revista científica *Virology* – Janeiro, 2015.

Dedicatória

Dedico esta tese ao meu avô.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Professor Doutor Ricardo Parreira, agradeço a oportunidade e o entusiasmo de realizar este trabalho, a constante disponibilidade para esclarecer todas as minhas dúvidas e inquietações, a incessante partilha de experiências e conhecimentos, a sinceridade e as palavras de incentivo, a confiança que depositou em mim e a forma prática como me ensinou a encarar as adversidades.

Ao meu coorientador, Professor Doutor Paulo Almeida, pela disponibilidade inegável e pelo apoio científico prestado.

A todos os elementos do Grupo de Virologia do IHMT, em especial à Professora Doutora Aida Esteves pela constante disponibilidade para responder a qualquer pedido de ajuda, pela partilha de conhecimentos e opiniões e pelo contributo direto para a realização de parte deste trabalho. Ao Professor Doutor João Piedade pelo encorajamento e palavras de incentivo e à Ângela Lopes pela disponibilidade, ajuda e acompanhamento ao longo de todo o trabalho e pela serenidade e boa disposição contagiantes.

À minha amiga e colega de mestrado Ana Tomás pela amizade, pelas gargalhadas, pelo consolo, apoio e encorajamento, por acreditar em mim, tal como sempre acreditei nela e por ser para mim um exemplo e motivo de orgulho. Ao James Mc Guinness pelo contributo direto na realização deste trabalho e à Beatriz do Bem pela troca de conselhos, desabafos e ideias sobre o tema do trabalho.

Aos meus amigos e familiares que se viram pontualmente privados da minha presença para que me pudesse dedicar à concretização deste trabalho, o meu sentido agradecimento pelas palavras de incentivo.

Ao Daniel pelo incentivo e apoio constantes, pelo carinho e paciência, pelas palavras de consolo e por ter suportado a minha ausência durante tanto tempo.

À minha irmã pelo apoio incondicional e disponibilidade imediata e por se orgulhar tanto de mim, tal como me orgulho dela.

Às pessoas mais importantes: os meus pais, por me terem dado a oportunidade de completar mais uma etapa na minha formação académica, pelo amor e carinho, pelas palavras de incentivo e confiança, por se preocuparem comigo, por me ensinarem o valor do esforço e do trabalho e sobretudo, por acreditarem em mim.

Resumo

O género *Negevirus* foi descrito pela primeira vez em 2013, tendo sido proposto como um novo grupo taxonómico de vírus específicos de insetos com uma ampla distribuição geográfica, e caracterizado por uma considerável diversidade de hospedeiros, entre os quais flebótomos do género *Lutzomyia* e mosquitos, maioritariamente do género *Culex* mas também *Anopheles* e *Aedes*. Em Portugal, a primeira identificação de um negevírus foi obtida de um lote de mosquitos da espécie *Oc. caspius*, após o seu coisolamento com um flavivírus específico de insetos OCFV_{PT}. A génese dos efeitos citopáticos exuberantes e de desenvolvimento rápido decorrentes da replicação destes vírus em culturas de células de inseto, a sua origem e evolução desconhecidas, as semelhanças de algumas das proteínas que codificam com as de vírus de plantas, e o seu potencial impacto na *fitness* e/ou na eventual competência vetorial dos insetos em que são encontrados, são questões que têm contribuído para o crescente interesse sobre o estudo destes vírus.

No decurso do trabalho que aqui se apresenta foi efetuada a deteção, isolamento e caracterização genética de novos negevírus de mosquitos colhidos no sul de Portugal, tentativamente definida a sua gama de hospedeiros e analisada a sua estratégia de replicação, usando células de inseto mantidas em cultura.

Através da utilização de RT-PCR e de *primers* degenerados (na sua maioria) foi possível identificar novas estirpes de negevírus, presentes em quatro espécies de mosquitos diferentes capturados no sul de Portugal: *Ochlerotatus caspius*, *Cx. pipiens*, *Cx. theileri* e *Cx. univittatus*. Inferências filogenéticas baseadas no alinhamento de sequências codificantes da polimerase viral, amplificadas de negevírus isolados em culturas de células C6/36, demonstraram a ocorrência de um novo grupo monofilético, filogeneticamente próximo do grupo monofilético do qual constam negevírus de tipo Negev e pertencente ao grupo taxonómico proposto recentemente, *Nelorpivirus*.

A análise da replicação de negevírus *in vitro* permitiu observar a presença de efeitos citopáticos extensos e de desenvolvimento rápido, embora sem indicação óbvia da entrada das células infetadas em apoptose. Estes vírus comprovaram replicar de forma muito rápida, tendo sido possível detetar genomas virais no sobrenadante de culturas celulares C6/36 infetadas, 4 horas após o início da infeção.

Neste trabalho foi também construído um vetor plasmídico, designado pIC111-V, o qual deverá permitir a expressão transitória de proteínas em células de inseto como consequência da presença de um promotor de transcrição de baculovírus reconhecido constitutivamente nestas células. A sua utilização na transfeção de células de inseto revelou poder representar um passo importante na melhoria das metodologias de análise proteómica nestas células.

Palavras-chave: negevírus; mosquitos; efeitos citopáticos; análise filogenética; replicação viral

Abstract

The genus *Negevirus*, described for the first time in 2013, was proposed as a new taxon of insect specific viruses with wide geographic distribution and characterized by a considerable host diversity, including *Lutzomyia* sandflies and mosquitoes mostly from the *Culex*, *Anopheles* and *Aedes* genera. In Portugal, the first identification of a negevirus was obtained as a result of its co-isolation with an insect-specific flavivirus, OCFV_{PT}. The genesis of exuberant cytopathic effects and the fast replication of these viruses in insect cell cultures, its source and evolution, the similarities of the proteins they encode with those encoded by plant viruses and the potential impact in the fitness and/or in the possible vector competence of the insects where these virus are found, are questions that fuel the growing interest in the study of these viruses.

In this report, detection, isolation and genetic characterization of new negeviruses of mosquitoes collected in the south of Portugal have been made, tentatively defining its host range and analyzing its replication strategy using insect cells maintained in culture.

By using RT-PCR and degenerate primers (mostly) it was possible to identify new negeviruses strains, present in four different species of mosquitoes trapped in the south of Portugal: *Ochlerotatus caspius*, *Cx. pipiens*, *Cx. theileri* e *Cx. univittatus*. Phylogenetic inferences based on alignments of coding sequences of the viral polymerase, amplified from isolated negeviruses in C6/36 cell cultures, showed the occurrence of a new monophyletic group, phylogenetically close to that which contains negeviruses Negev-like and that belongs to the proposed recently, *Nelorpivirus* taxon.

The analysis of negeviruses replication *in vitro* allowed us to observe the presence of extensive cytopathic effects with fast development, although with no obvious indication that infected cells undergo extensive apoptosis. Viral replication was confirmed to occur quickly, and it was possible to detect viral genomes in the infected C6/36 cell culture supernatant, 4 hours after the onset of infection.

In this report, it was also constructed a plasmid vector, designated pIC111-V, which should allow the transient expression of proteins in insect cells, as a consequent of the presence of a baculovirus transcriptional promoter. Its use in transfection of insect cells transfection may be an important step in the improving of the proteomics analysis methodologies in these cells.

Keywords: negeviruses; mosquitoes; cytopathic effects; phylogenetic analysis; viral replication

Índice Geral

Elementos Bibliográficos Resultantes da Dissertação	v
Dedicatória	vii
Agradecimentos	ix
Resumo	xi
Abstract	xiii
Índice Geral	xv
Índice de Figuras	xix
Índice de Tabelas	xxiii
Lista de Abreviaturas	xxv
 1. Introdução	 1
1.1. Os mosquitos (<i>Diptera</i>, <i>Culicidae</i>) e a sua importância	2
1.2. Emergência de novos vírus associados a artrópodes	5
1.3. Contributo do desenvolvimento das técnicas moleculares para a descoberta de vírus específicos de insetos	8
1.4. O género <i>Negevirus</i>	10
1.4.1. Caracterização filogenética dos negevírus	10
1.4.2. Distribuição geográfica e diversidade de hospedeiros	11
1.4.3. Manutenção na Natureza	13
1.4.4. Organização genómica	13
1.5. Características da replicação de vírus de RNA de polaridade positiva	15
1.6. Objetivos	20
 2. Material e Métodos	 21
2.1. Origem e captura de mosquitos	22
2.2. Produção de macerados de mosquitos	23
2.3. Manipulação de linhas celulares infetadas e não infetadas	23
2.3.1. Cultura de células C6/36 e isolamento viral	23
2.3.2. Cultura de células HEK293T	24

Índice Geral

2.3.3. Transfecção de células HEK293T e de células C6/36	25
2.4. Cinética da replicação viral	26
2.5. Avaliação da indução de apoptose	27
2.6. Microscopia eletrónica de transmissão.....	28
2.7. Análise de proteínas solúveis totais por SDS-PAGE	28
2.8. Extração de RNA viral	29
2.9. Síntese de cDNA	30
2.10. Desenho e características de oligonucleótidos (<i>primers</i>) utilizados na amplificação/sequenciação de sequências virais	30
2.11. Amplificações de sequências genómicas viral	33
2.11.1. Amplificação de fragmentos de DNA por PCR convencional.....	33
2.11.2. Amplificação fragmentos de DNA por PCR em tempo real	35
2.12. Hidrólise de DNA com endonucleases de restrição	36
2.13. Clonagem de produtos de PCR	37
2.13.1. Clonagem no vetor plasmídico pJet1.2/ <i>blunt</i>	37
2.13.2. Clonagem de DNA usando o vetor plasmídico pIC111	38
2.14. Preparação de células competentes de <i>Escherichia coli</i> e a sua transformação por choque térmico.....	39
2.15. Extração, em pequena escala, de DNA plasmídico por lise alcalina	40
2.16. Purificação de DNA	41
2.16.1. Purificação de moléculas de DNA amplificadas por PCR	41
2.16.2. Purificação de moléculas de DNA plasmídico.....	42
2.17. Sequenciação de DNA e análise de sequências nucleotídicas e aminoácidas.	43
3. Resultados	45
3.1. Distribuição qualitativa de negevírus em diferentes espécies de mosquitos colhidos no sul de Portugal	46
3.2. Isolamento viral e análise microscópica de células C6/36 infetadas.....	51
3.3. Análises filogenéticas das sequências de negevírus obtidas	56
3.4. Características ultraestruturais associadas à replicação viral do OCNV ₁₇₄ em cultura de células	61

3.5.	Expressão de proteínas virais durante a replicação viral do OCNV ₁₇₄ em células C6/36: análise de perfis de proteínas solúveis totais por SDS-PAGE	63
3.6.	Indução de apoptose durante a replicação viral do OCNV ₁₇₄ em células C6/36	66
3.7.	Cinética da replicação viral do OCNV ₁₇₄ em células C6/36.....	68
3.8.	Construção de vetor plasmídico recombinante com sequência de um promotor de transcrição reconhecido em células de inseto	71
3.9.	Expressão de EGFP a partir do vetor pIC111-V em células eucariontes: análise por microscopia de fluorescência	74
3.10.	Construção de plasmídeos para expressão de proteínas codificadas pelas ORF1, ORF2 e ORF3 de OCNV ₁₇₄ fundidas, em C-terminal, à EGFP	76
4.	Discussão e Conclusões	83
4.1.	Identificação de negevírus em mosquitos colhidos no sul de Portugal	84
4.2.	Análise da replicação de negevírus: OCNV ₁₇₄ como modelo de estudo	91
4.3.	Construção do vetor plasmídico pIC111-V para expressão constitutiva de proteínas em células de inseto	95
5.	Referências Bibliográficas.....	101
6.	Anexos	115
	Anexo 1 – Mapa físico e sequência parcial do vetor plasmídico pJet1.2/ <i>blunt</i>	116
	Anexo 2 – Mapa físico e sequência parcial do vetor plasmídico pIC111	117

Índice de Figuras

Figura 1 - Distribuição geográfica de vários novos vírus associados a artrópodes descobertos na última década...	5
Figura 2 – Árvore filogenética construída com base no critério de máxima verosimilhança revelando a existência de seis linhagens distintas de negevírus, filogeneticamente distintas do CiLV-C..	11
Figura 3 – Distribuição geográfica mundial de negevírus isolados entre 2013 e 2014.	12
Figura 4 – Organização genómica dos negevírus: posição das grelhas de leitura aberta e domínios proteicos conservados.	15
Figura 5 – Replicação de vírus com genoma de ssRNA ⁺ .	16
Figura 6 – Imagens de microscopia eletrónica das alterações membranares caracterizadas pela formação de esférulas durante a replicação dos vírus BMV e FHV e respetivos diagramas dos complexos replicativos.	18
Figura 7 – Imagens de microscopia eletrónica, a duas e três dimensões, das alterações membranares associadas ao retículo endoplasmático, induzidas pela replicação do DENV.	19
Figura 8 – Imagens de microscopia eletrónica, a duas e três dimensões, das alterações membranares associadas ao retículo endoplasmático, induzidas pela replicação do SARS-V.	20
Figura 9 – Rastreio da presença de vírus Negev, Piura, Ngewotan, e/ou vírus geneticamente semelhantes a estes, em extratos de RNA preparados a partir de macerados de mosquitos das espécies <i>Cx. pipiens</i> e <i>Cx. univittatus</i> ..	47
Figura 10 – Rastreio da presença de vírus de tipo Negev, Piura, Ngewotan, e/ou vírus geneticamente semelhantes a estes, em extratos de RNA preparados a partir de macerados de mosquitos das espécies <i>Oc. caspius</i> , <i>Cx. pipiens</i> e <i>Cx. univittatus</i>	48

Índice de Figuras

Figura 11 – Rastreio da presença de vírus Loreto e/ou vírus geneticamente semelhantes a estes, em extratos de RNA preparados a partir de macerados de mosquitos da espécie <i>Oc. caspius</i>	49
Figura 12 – Rastreio da presença de vírus Santana e Dezidougou, e/ou vírus geneticamente semelhantes a estes, em extratos de RNA preparados a partir de macerados de mosquitos da espécie <i>Cx. theileri</i>	50
Figura 13 – Distribuição de sequências de presumíveis negevírus em diferentes espécies de mosquitos capturados no Algarve. Mapa do Algarve e pontos de colheita distribuídos por três regiões principais: oeste, centro e este. Identificação dos lotes de macerados e espécies de mosquitos potencialmente sugestivos de conterem genomas de negevírus e respetivos pontos de colheita.	51
Figura 14 – Análise por microscopia ótica (ampliação de 400x) de células C6/36 não infetadas e 72h após infeção com uma alíquota do macerado 595, na qual foi detetada a presença de flavivírus e do macerado 207, no qual foi detetada a presença de flavivírus OCFV _{PT} em simultâneo com negevírus	53
Figura 15 – Análise por microscopia ótica (ampliação de 400x) de células C6/36 não infetadas e 24h, 48h e 72h (ampliação de 200x) após infeção com um macerado de mosquitos da espécie <i>Cx. univittatus</i>	54
Figura 16 – Identificação da presença de genomas de negevírus e flavivírus por RT-PCR em extratos de RNA preparados a partir de sobrenadantes de cultura após isolamento viral.	56
Figura 17 – Relação filogenética entre sequências de negevírus baseada num alinhamento de sequências nucleotídicas correspondentes a uma secção da polimerase viral, com aproximadamente 1000 pb. Árvores filogenéticas construídas com base no critério de máxima verosimilhança (ML) utilizando como modelo evolutivo GTR+I+Γ e com base no método de junção de vizinhos (NJ) utilizando como modelo de substituição Kimura 2-Paramêtros.	59

Figura 18 – Relação filogenética entre sequências de negevírus baseada num alinhamento de sequências nucleotídicas correspondentes a uma secção da polimerase viral, com aproximadamente 2400 pb. Árvore filogenética construída com base no método de junção de vizinhos (NJ) utilizando como modelo de substituição Kimura 2-Paramêtros cuja consistência topológica foi avaliada com base numa análise de <i>bootstrapping</i> , usando 1000 amostragens aleatórias dos dados iniciais.	60
Figura 19 – Alterações morfológicas induzidas pela replicação viral do OCNV ₁₇₄ em células C6/36. Análise por microscopia ótica (ampliação de 400x) de células C6/36 não infetadas e 48h após infeção com OCNV ₁₇₄	62
Figura 20 – Análise por microscopia eletrónica de transmissão de secções finas de células C6/36 não infetadas e 48 horas após infeção com OCNV ₁₇₄	63
Figura 21 – Avaliação da presença de proteínas solúveis em extratos celulares infetados com OCNV ₁₇₄ obtidos a partir de meios de cultura suplementados com 2 % de FBS e recolhidos a diferentes tempos após infeção (24, 48 e 72 horas)	66
Figura 22 – Avaliação da indução de apoptose durante a replicação viral do OCNV ₁₇₄ . Eletroforese em gel de agarose 0,8 % (p/v) do perfil eletroforético de extratos de DNA genómico total obtidos a partir de sedimentos de células não infetadas e infetadas com OCNV ₁₇₄ , recolhidas com diferentes tempos de incubação (0, 24, 48 e 72 horas).	67
Figura 23 – Estudo da cinética da replicação viral do OCNV ₁₇₄	69
Figura 24 – Construção do vetor plasmídico recombinante com a sequência do promotor OpIE1.	73
Figura 25 – Identificação de plasmídeos recombinantes contendo a sequência do promotor OpIE1 derivado do vetor pIZT/His-V5.	74
Figura 26 – Análise por microscopia de fluorescência (ampliação 100x) do resultado da transfeção das linhas celulares HEK293T e C6/36 com o vetor plasmídico pIC111-V..	76
Figura 27 – Produtos de amplificação específica obtidos por RT-PCR a partir de extratos de RNA total e utilizando os pares de <i>primers</i> orf1BamHI/orf1NotI,	

Índice de Figuras

orf2BamHI/orf2NotI e orf3BamHI/orf3NotI para amplificar sequências de domínios correspondentes às ORF1 (domínio da polimerase viral), ORF2 e ORF3, respetivamente do genoma do OCNV₁₇₄.....78

Figura 28 – Estabilização dos fragmentos do genoma viral do OCNV₁₇₄ codificados pelo domínio da polimerase viral presente na ORF1 e pelo domínio da ORF2 no vetor plasmídico pJet1.2/*blunt*.....79

Figura 29 – Confirmação da presença da sequência referente ao domínio da ORF2 do genoma do OCNV₁₇₄ no vetor plasmídico pIC111-V.81

Índice de Tabelas

Tabela 1 – <i>Primers</i> utilizados para amplificação/sequenciação do genoma de negevírus	31
Tabela 2 – Valores de <i>Ct</i> obtidos na reações de amplificação em tempo real para cada amostra, correspondentes a alíquotas de sobrenadantes de cultura colhidos com diferentes tempos após infecção (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 e 48 horas).	70

Lista de Abreviaturas

°C	graus <i>Celsius</i>
µg	micrograma (s) = 10 ⁻⁶ grama
µL	microlitro (s) = 10 ⁻⁶ litro
µm	micrómetro (s) = 10 ⁻⁶ metro
µM	micromolar = 10 ⁻⁶ molar
<i>Ae.</i>	<i>Aedes</i>
<i>An.</i>	<i>Anopheles</i>
BLAST	ferramenta bioinformática, do inglês <i><u>B</u>asic <u>L</u>ocal <u>A</u>lignment <u>S</u>earch <u>T</u>ool</i>
BMV	do inglês <i><u>B</u>rome <u>M</u>osaic <u>V</u>irus</i>
BSA	albumina sérica bovina, do inglês <i><u>B</u>ovine <u>S</u>erum <u>A</u>lbumine</i>
CAP	do inglês <i><u>C</u>ontig <u>A</u>ssembly <u>P</u>rogram</i>
CDC	do inglês <i><u>C</u>enters for <u>D</u>isease <u>C</u>ontrol</i>
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementar
CFAV	do inglês <i><u>C</u>ell <u>F</u>using <u>A</u>gent <u>V</u>irus</i>
CHIKV	vírus chikungunya
CiLV-C	do inglês <i><u>C</u>itrus <u>L</u>eprosis <u>V</u>irus <u>C</u>ytoplasmic type</i>
CM	do inglês <i><u>C</u>onvoluted <u>M</u>embranes</i>
CMV	citomegalovírus
CO ₂	dióxido de carbono

Lista de Abreviaturas

CPE	efeitos citopáticos, do inglês <i>Cytopathic Effect</i>
<i>Ct</i>	do inglês <i>Cycle Threshold</i>
CTFV	flavivírus de <i>Culex theileri</i>
<i>Cu.</i>	<i>Culiseta</i>
<i>Cx.</i>	<i>Culex</i>
CxFV	flavivírus de <i>Culex</i>
DENV	vírus da dengue
DMEM	meio de Eagle modificado por Dulbecco, do inglês <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	dimetilsulfóxido, do inglês <i>Dimethyl Sulfoxide</i>
DMV	vesículas de membrana dupla, do inglês <i>Double-Membrane Vesicles</i>
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTPs	desoxirribonucleótidos 5'-trifosfato
dsRNA	RNA de polaridade dupla
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético, do inglês <i>Ethylene Diamine Tetracetic Acid</i>
EGFP	proteína verde-fluorescente com fluorescência aumentada, do inglês <i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
ER	retículo endoplasmático, do inglês <i>Endoplasmatic Reticulum</i>
<i>et al.</i>	locução latina <i>et alli</i> , indicando que a obra a que se faz referência tem mais do que um autor, mencionando-se apenas o primeiro
E.U.A.	Estados Unidos da América
EVE	do inglês <i>Endogenous Viral Elements</i>

FBS	soro bovino fetal, do inglês <i>Fetal Bovine Serum</i>
FHV	do inglês <i>Flock House Virus</i>
g	grama (s)
g	unidade de campo gravitacional, utilizada como unidade de força centrífuga relativa
GANV	vírus Goutanap
HANKV	vírus Hanko
IHMT	Instituto de Higiene e Medicina Tropical
IRES	do inglês <i>Internal Ribosome Entry Site</i>
ISF	flavivírus específicos de insetos, do inglês <i>insect-specific flavivirus</i>
kDa	quilo Dalton = 10^3 Daltons
Km	quilómetro = 10^3 metros
KRV	vírus Kamiti River
LB	meio de cultura <i>Luria-Bertani</i>
MgCl ₂	cloreto de magnésio
MIR	do inglês <i>Minimum Infection Rate</i>
ML	Máxima verosimilhança, do inglês <i>Maximum-Likelihood</i>
mL	mililitro (s) = 10^{-3} litro
mm	milímetro (s) = 10^{-3} metro
mM	milimolar = 10^{-3} molar
mRNA	ácido ribonucleico mensageiro
NaCl	cloreto de sódio

Lista de Abreviaturas

NaOH	hidróxido de sódio
NCBI	do inglês <i>N</i> <u>a</u> tional <i>C</i> <u>e</u> nter for <i>B</i> <u>i</u> otechnology <i>I</i> <u>n</u> formation
ng	nanograma (s) = 10^{-9} grama
NGS	do inglês <i>N</i> <u>e</u> xt <i>G</i> <u>e</u> neration <i>S</i> <u>e</u> quencing
NJ	Junção de Vizinhos, do inglês <i>N</i> <u>e</u> ighbor- <i>J</i> <u>o</u> ining
nm	nanómetro (s) = 10^{-9} metro
nM	nanomolar = 10^{-9} molar
<i>Oc.</i>	<i>Ochlerotatus</i>
OCFV _{PT}	flavivírus de <i>Ochlerotatus caspius</i> (Portugal)
ORF	grelha de leitura aberta, do inglês <i>o</i> <u>p</u> en <i>r</i> <u>e</u> ading <i>f</i> <u>r</u> ames
pb	pares de bases, do inglês <i>b</i> <u>a</u> se- <i>p</i> <u>a</u> irs
PBS	solução de soro fisiológico tamponada com fosfatos, do inglês <i>P</i> <u>h</u> osphate- <i>B</i> <u>u</u> ffered <i>S</i> <u>a</u> line
PCR	reação em cadeia da polimerase de DNA, do inglês <i>P</i> <u>o</u> lymerase <i>C</i> <u>h</u> ain <i>R</i> <u>e</u> action
PEG	polietilenoglicol
PEI	polietilenimina
p.f.u.	unidades formadoras de placas, do inglês <i>P</i> <u>l</u> aque <i>F</i> <u>o</u> rming <i>U</i> <u>n</u> it
pH	simétrico do algoritmo decimal da concentração hidrogeniónica de uma solução
pmol	picomole = 10^{-12} moles
Poli(A)	cauda poliadenilada
p/v	peso por volume

PVDF	do inglês <i>Polyvinylidene Difluoride</i>
RACE	do inglês <i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i>
RdRp	polimerase de RNA dependente de RNA, do inglês <i>RNA-dependent RNA polymerase</i>
RNA	ácido ribonucleico, do inglês <i>Ribonucleic Acid</i>
RNAi	ácido ribonucleico de interferência
rpm	rotações por minuto
RT	reação de transcrição reversa, do inglês <i>Reverse Transcription</i>
RT-PCR	reação de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase de DNA, do inglês <i>Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction</i>
SARS-V	do inglês <i>Severe Acute Respiratory Syndrome Virus</i>
SDS	dodecil sulfato de sódio, do inglês <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS, do inglês <i>SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SISPA	do inglês <i>Sequence-Independent Single Primer Amplification</i>
SOC	meio de cultura otimizado para crescimento bacteriano em condições de repressão catabólica, do inglês <i>Super Optimal broth with Catabolite repression</i>
ssRNA ⁺	ácido ribonucleico de cadeia simples com polaridade positiva
TAE	tampão <i>Tris-Acetato-EDTA</i>
TANAV	vírus Tanay
TEG	tampão <i>Tris-EDTA-Glucose</i>
TE	tampão <i>Tris-EDTA</i>

Lista de Abreviaturas

TEM	microscopia eletrónica de transmissão, do inglês <i><u>T</u>ransmission <u>E</u>lectron <u>M</u>icroscopy</i>
Tris	Tris (Hidroximetil) Aminometano
Tris-HCl	Tris (Hidroximetil) Aminometano – ácido clorídrico
TSS	solução de armazenamento e transformação, do inglês <i><u>T</u>ransformation and <u>S</u>torage <u>S</u>olution</i>
U	unidade de atividade enzimática
UTR	regiões não traduzidas, do inglês <i><u>U</u>n<u>t</u>ranslated <u>R</u>egions</i>
V	Volt, unidade de tensão elétrica
VIDISCA	do inglês <i><u>V</u>irus <u>D</u>iscovery <u>c</u>DNA-<u>A</u>FLP (<u>A</u>mplified <u>E</u>ragment <u>L</u>ength <u>P</u>olymorphism)</i>
VP	do inglês <i><u>V</u>esicle <u>P</u>acks</i>
v/v	volume por volume
WALV	vírus Wallerfield

1|

INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1. Os mosquitos (*Diptera*, *Culicidae*) e a sua importância

Os mosquitos são insetos dípteros pertencentes à família *Culicidae* e encontram-se distribuídos por três subfamílias: *Anophelinae* e *Culicinae*, das quais fazem parte espécies com importância médica, e *Toxorhynchitinae*, constituída por espécies sem importância médica, dado que os mosquitos fêmeas não se alimentam de sangue de vertebrados. A família *Culicidae* está, igualmente, dividida em géneros, dos quais se destacam os géneros *Anopheles* (subfamília *Anophelinae*), *Culex* e *Aedes* (subfamília *Culicinae*), pelo facto de reunirem espécies de mosquitos hematófagas, capazes de transmitir agentes patogénicos ao Homem e a outros animais vertebrados (Almeida, 2011). Para além do seu papel enquanto vetores de parasitas unicelulares, como as diferentes espécies do género *Plasmodium* passíveis de causarem malária, e parasitas multicelulares, como as filárias causadoras de filariose linfáticas, alguns mosquitos são também vetores de vários vírus patogénicos causadores de arboviroses. Destes são exemplos o vírus da febre amarela e da dengue, ou o vírus chikungunya. Estes vírus são genericamente designados de arbovírus (do inglês *arthropod-borne viruses*) e são mantidos na natureza essencialmente por transmissão horizontal, em ciclos que envolvem um vetor invertebrado e um hospedeiro vertebrado. Através da picada do vetor hematófago, o vírus é transmitido ao hospedeiro num processo denominado de transmissão biológica, que envolve replicação dos vírus nos mosquitos e a sua disseminação pelos tecidos do inseto (Weaver e Reisen, 2010).

A maioria dos arbovírus transmitidos por mosquitos e que causam impactos significativos na saúde Humana e na veterinária, têm genoma de RNA e distribuem-se por quatro famílias: *Togaviridae*, na qual se inclui o género *Alphavirus*, e na qual são classificados vírus causadores de doenças como a encefalite equina do leste, do oeste e venezuelana; *Flaviviridae*, género *Flavivirus*, cujos vírus são responsáveis por doenças como a febre amarela, a dengue, a febre do Nilo Ocidental e a encefalite Japonesa; *Bunyaviridae* à qual pertencem os géneros *Orthobunyavirus*, *Nairovirus* e *Phlebovirus*, e da qual se destacam os vírus causadores de doenças como a febre hemorrágica da Crimeia-Congo, a febre do vale do Rift e a encefalite de La Crosse; e *Rhabdoviridae*, género *Vesiculovirus*, na qual se incluem os vírus responsáveis pela estomatite vesicular Indiana, de Alagoas e Nova Jérnia (Hubálek *et al.*, 2014).

Devido ao considerável impacto dos mosquitos na saúde pública e veterinária, vários programas de controlo de doenças transmitidas por estes insetos têm sido efetuados, nos quais se incluem estudos de vigilância entomológica, cujo principal objetivo é avaliar a distribuição geográfica, bem como a abundância relativa, de potenciais populações vetorais de agentes patogénicos. Muitos desses estudos têm sido efetuados na Europa, alguns em Portugal continental, pelo facto de ser um país com um elevado nível de risco para a incidência de doenças infecciosas transmitidas por mosquitos. O risco associado resulta, essencialmente, da conjugação de dois fatores: das alterações climáticas que se têm registado em Portugal, prevendo um impacto potencial na saúde humana (Calheiros, 2006) e da presença de populações abundantes de mosquitos competentes para a transmissão de diversos agentes patogénicos (Almeida, 2011). Uma das alterações climáticas registadas prende-se com o aquecimento global, o qual se prevê contribuir para o aumento da densidade de mosquitos na Primavera e Outono, quer devido ao aumento do período favorável para a sua reprodução (número de semanas em que as condições climáticas são favoráveis à manutenção de grandes populações de mosquitos) quer da diminuição direta do período de incubação extrínseco dos agentes patogénicos nos vetores (Calheiros, 2006).

Adicionalmente, a fauna culicideológica em Portugal continental pode vir a ser alterada, no caso de se verificar a introdução de outras espécies de mosquitos vetores tais como *Ae. albopictus*, um dos vetores mais competentes na transmissão, por exemplo, do vírus da dengue (Benedict *et al.*, 2007) e com grande sucesso de implantação¹ previsto para Portugal (Straetemans *et al.*, 2008) e *Ae. aegypti*, reconhecido como vetor do vírus da dengue, da febre amarela e chikungunya. A introdução de espécies exóticas de mosquitos é feita geralmente sob a forma de ovos, e resulta essencialmente de trocas comerciais, como o transporte internacional de pneus (Benedict *et al.*, 2007) ou de plantas ornamentais (Straetemans *et al.*, 2008).

Os estudos efetuados em Portugal continental entre 2004 e 2010 revelaram que as espécies de mosquito mais abundantes e dispersas no país eram *Cx. theileri*, *Cx.*

¹ Resulta de quatro condições ambientais principais: 1) **Temperaturas no inverno**: acima de 0°C, caso contrário os ovos morrem; 2) **Precipitação anual**: pelo menos 500 mm³ anuais fornecem água suficiente para os mosquitos se reproduzirem; 3) **Chuvas de verão**: são necessárias para manter os locais de reprodução durante o verão; 4) **Temperaturas de verão**: influenciam velocidade de desenvolvimento de fases imaturas para mosquitos adultos. Ideal entre 25-30°C.

1. Introdução

pipiens e *Ochlerotatus caspius* (Almeida *et al.*, 2008; Almeida *et al.*, 2010; Osório *et al.*, 2010). Estas espécies são atualmente reconhecidas como vetores de arbovírus, tais como o vírus do Nilo Ocidental, Tahyna e da febre do Vale do Rift (Lundström, 1999; Hubálek, 2008), constituindo um potencial problema de saúde pública para Portugal continental.

Durante os últimos anos, a maioria dos projetos de investigação científica que envolvem o estudo de vírus transmitidos por mosquitos têm sido efetuados com base nos potenciais impactos destes últimos, na medicina humana e veterinária (Junglen e Drosten, 2013). Adicionalmente, o interesse pela ecologia de vírus patogénicos tem surgido, essencialmente, devido à grande diversidade e rápida evolução dos vírus, que pressupõe um aumento dos esforços com enfoque na sua vigilância epidemiológica, como se tem verificado, por exemplo, com o vírus da dengue (Badurbeen *et al.*, 2013; Lourenço e Recker, 2014) transmitido por *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*. Além disso, a necessidade de desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico, vacinas ou a definição clara de etiologias, tem também contribuído para o interesse por este tipo de vírus.

No entanto, os vírus são presumivelmente, as entidades biológicas mais abundantes do planeta (Hulo *et al.*, 2011), possuindo uma dispersão geográfica a nível mundial e uma vasta, e diversa, gama de hospedeiros. Como tal, conduzir a maioria das investigações para a pesquisa de vírus com aplicação prática, leva a que grande parte da diversidade viral permaneça por descobrir, podendo, inclusivamente, um número significativo destes vir a ser encontrado em mosquitos sem importância médica. Este fenómeno contribui para um lamentável viés do conhecimento do mundo natural, mas está tendencialmente a ser contrariado, dado que o número de vírus associados a insetos descritos na literatura (sendo estes transmitidos, ou não, a humanos ou outros animais) está a aumentar regularmente (Mokili *et al.*, 2012).

1.2. Emergência de novos vírus associados a artrópodes

O aumento de oportunidades e metodologias para o estudo e caracterização de novos vírus tem permitido não só revelar a existência de alguns vírus potencialmente patogénicos, mas também a existência de uma imensa diversidade de vírus, muitos dos quais sem relevância em termos clínicos, associada a vários tipos de artrópodes (Junglen e Drosten, 2013). Na figura 1 constam alguns dos vírus descritos essencialmente durante a última década, um pouco por todo o mundo, isolados de mosquitos dos mais variados géneros como *Anopheles*, *Culex*, ou *Uranotaenia*, e também de culicídeos do género *Culicoides*, como o vírus Schmallerberg (Wernike *et al.*, 2014) e de carraças dos géneros *Haemaphysalis*, *Rhipicephalus*, e *Amblyomma*, de onde, por exemplo, foram isolados os vírus Lone Star (Swei *et al.*, 2013) e os vírus Bhanja e Palma (Dilcher *et al.*, 2012), o último em Portugal. Frequentemente, por cada estudo efetuado são descritos mais do que um vírus (Mokili *et al.*, 2012) sugerindo que os vírus específicos de insetos são agentes bastante mais comuns e abundantes na natureza, do que se julgava.

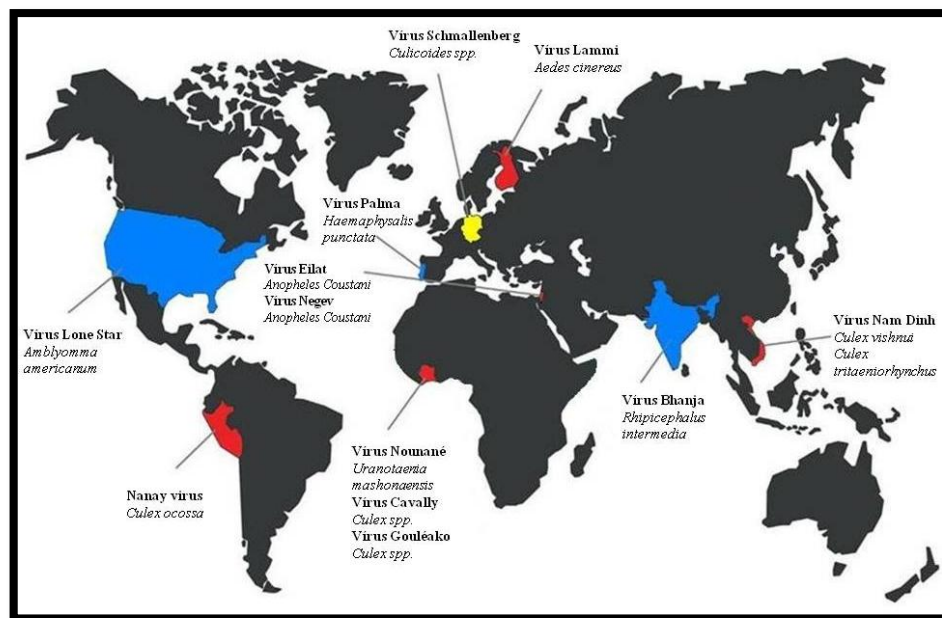


Figura 1 - Distribuição geográfica de vários novos vírus associados a artrópodes, descobertos na última década. As regiões coloridas correspondem aos países onde os vírus foram isolados de insetos pela primeira vez. Em azul estão identificados países cujos vírus foram isolados de carraças (*Haemaphysalis punctata*, *Rhipicephalus intermedia* e *Amblyomma americanum*) em amarelo, vírus isolado de culicídeos (*Culicoides spp.*) e, em vermelho, vírus isolados de mosquitos (*An. coustani*, *Ae. cinereus*, *Uranotaenia mashonaensis*, *Cx. ocossa*, *Cx. vishnui*, *Cx. tritaeniorhynchus* e *Culex spp.*). Adaptado de Junglen e Drosten, 2013.

1. Introdução

A denominação “vírus específicos de insetos” começou por ser utilizada para descrever vírus do género *Flavivirus*, presentes naturalmente em inúmeras populações de mosquitos e que aparentavam replicar exclusivamente em células destes invertebrados. Embora estes vírus, designados genericamente de ISF (do inglês *insect-specific flavivirus*) possuam uma organização genómica idêntica à dos demais flavivírus que infetam vertebrados, para além de não replicarem em células de vertebrado (quer *in vivo*, quer *in vitro*), não aparentam ser mantidos através de um ciclo de transmissão semelhante aos que permitem a manutenção dos arbovírus na Natureza (Kuno, 2007).

A grande maioria dos ISF começou por surgir associada a mosquitos dos géneros *Aedes* e *Culex* (Cook *et al.*, 2012), sendo representados, entre outros, pelos designados vírus *Cell Fusing Agent* (CFAV), isolados pela primeira vez em 1975, de mosquitos *Ae. aegypti* (Stollar e Thomas, 1975), pelo vírus Kamiti River (KRV) isolado de mosquito da espécie *Ae. macintoshi* em 2003 no Quénia (Crabtree *et al.*, 2003) e, mais recentemente, os flavivírus de *Culex* (CxFV), cujo primeiro isolado foi obtido em 2007 a partir de mosquitos da espécie *Cx. pipiens* (Hoshino *et al.*, 2007).

O interesse crescente pela ecologia dos ISF conduziu a um aumento do número de investigações sobre estes vírus, e consequentemente, a um aumento do repertório deste tipo de vírus. Na última década foram descritos diversos novos ISF, dos quais se destacam aqueles que foram isolados de espécies de mosquito dos géneros *Aedes* spp. e *Culex* spp. tais como o vírus Lammi isolado de *Ae. cinereus* na Finlândia (Huhtamo *et al.*, 2009), o vírus Calbertado de *Cx. tarsalis* colhidos no Canadá (Boelling *et al.*, 2011) e o vírus Nanay, isolado de *Cx. ocosa* no Perú (Evangelista *et al.*, 2013). Descobertas recentes relevaram, igualmente, a existência de ISF associados a espécies de mosquitos hospedeiros de outros géneros (Calzolari *et al.*, 2012), tal como o vírus Nakiwogo isolado de *Mansonia africana nigerrima* no Uganda (Cook *et al.*, 2009), o vírus Nounané isolado de *Uranotaenia mshonaensis* na Costa do Marfim (Junglen *et al.*, 2009) e o vírus Aripo isolado de *Psorophora albipes* (Auguste *et al.*, dados por publicar).

Embora durante os últimos anos, a grande maioria dos estudos, muito deles efetuados com base em análises filogenéticas e de evolução molecular, tenham permitido a identificação de diversos novos flavivírus, rapidamente se constatou, e talvez de modo não surpreendente, que a diversidade dos vírus com genomas de RNA

associados a insetos, e a mosquitos em particular, se estendia para além dos flavivírus (Figura 1). Assim, foi possível começar a identificar vários vírus específicos de insetos pertencentes a outros géneros tais como, *Alphavirus* (família *Togaviridae*) do qual é exemplo o vírus Eilat, isolado de mosquitos *An. coustani* em Israel (Nasar *et al.*, 2012). Foram igualmente propostos novas *taxa*, tais como o género *Dinovernavirus* (família *Reoviridae*), resultado da identificação do reovírus de *Aedes pseudoscutellaris* (Attoui *et al.*, 2005), enquanto alguns vírus, tais como o recentemente designado vírus Gouléako, isolado em várias espécies de mosquitos dos géneros *Anopheles*, *Culex* e *Uranotaenia*, na Costa do Marfim (Marklewitz *et al.*, 2011), permanecem por classificar dentro da família *Bunyaviridae*. Recentemente foi descrita, inclusivamente, uma nova família de vírus específicos de insetos, denominada *Mesoniviridae* (Lauber *et al.*, 2012), incluída na Ordem *Nidovirales*, e na qual foram incluídos (no género *Alphamesonivirus*) o vírus Cavally isolado de *Cx. nebulosus* na Costa do Marfim (Zirkel *et al.*, 2011), o vírus Nam Dinh isolado de *Cx. vishnui* e *Cx. tritaeniorhynchus* no Vietname (Nga *et al.*, 2011), e o vírus Casuarina, isolado de mosquitos *Coquillettidia xanthogaster* na Austrália (Warrilow *et al.*, 2014).

Particularmente em Portugal, algumas equipas de investigação têm-se dedicado, nos últimos anos, à exploração da diversidade viral patente em populações naturais de mosquitos, sobretudo no sul do país, tendo sido possível, até ao presente, identificar alguns ISF como o flavivírus de *Culex theileri* (CTFV) (Parreira *et al.*, 2012) e o flavivírus de *Ochlerotatus caspius* (OCFV_{PT}) (Ferreira *et al.*, 2013). Curiosamente, e acidentalmente, o OCFV_{PT} foi coisolado a partir de um lote de mosquitos onde, adicionalmente, se constatou a presença de um outro vírus filogeneticamente distinto, atualmente colocado num grupo diverso de vírus de RNA reconhecidos como negevírus, identificados em várias espécies de insetos (mosquitos e flebótomos) colhidos em vários continentes (Ferreira *et al.*, 2013; Vasilakis *et al.*, 2013; Auguste *et al.*, 2014; Nabeshima *et al.*, 2014). Este grupo parece representar um novo género (*Negevirus*) de agentes virais específicos de insetos e será utilizado como objeto de estudo na presente dissertação (ver secções seguintes).

Embora os vírus específicos de insetos, descritos até hoje, não sejam responsáveis por causarem doenças a humanos ou outros animais, o interesse crescente pela sua origem, evolução, e ecologia tem contribuído para a expansão do conhecimento

1. Introdução

básico sobre os mesmos. Adicionalmente, a sua análise tem levantado questões que se prendem com o seu potencial impacto na replicação de outros vírus, tendo estudos recentes descrito que a coinfeção de mosquitos, ou linhas celulares deles derivadas, com flavivírus patogénicos e ISF, pode potenciar, ou suprimir, a replicação dos primeiros, estando os ISF diretamente implicados na determinação da competência dos vetores (Bolling *et al.*, 2012; Hobson-Peters *et al.*, 2013; Kenney *et al.*, 2014; Kent *et al.*, 2010; Kent *et al.*, 2010).

1.3. Contributo do desenvolvimento das técnicas moleculares para a descoberta de vírus específicos de insetos

Anteriormente ao desenvolvimento de técnicas moleculares, baseadas em amplificações de sequências genómicas virais, várias técnicas como a filtração, a cultura em tecidos, a microscopia eletrónica, a serologia e a vacinação eram aplicadas na deteção de vírus (Mokili *et al.*, 2012). Destas técnicas, os sistemas de culturas celulares, utilizados para a descoberta de arbovírus, tornaram-se particularmente importantes, sendo mesmo considerados a tecnologia padrão neste campo.

Desde o aparecimento das primeiras abordagens moleculares que a deteção da maioria de novos vírus, bem como a sua análise e caracterização, tem sido efetuada com base em protocolos de amplificação de secções do genoma viral, baseados em dois tipos de métodos: dependentes e independentes de um conhecimento *a priori* das sequências a detetar. A utilização dos primeiros implica a realização de reações de RT-PCR/PCR, frequentemente precedidas do isolamento dos vírus em culturas celulares. No entanto, qualquer abordagem que implique a amplificação, ainda que parcial, de sequências genómicas virais das quais se possua um conhecimento *a priori* das sequências a amplificar, limita, por si só, a possibilidade de se descobrirem vírus geneticamente divergentes dos que se conhecem até hoje. Além disso, o facto de alguns vírus serem difíceis de manter em cultura, ou até mesmo incapazes de replicar em células mantidas *in vitro* (Junglen e Drosten, 2013; Canuti e Hoek, 2014), levam a limitações impostas por este tipo de abordagem, sugerindo a inovação de tecnologias, independentes de sistemas de culturas e/ou do conhecimento prévio de sequências virais e, com uma

cobertura de deteção de novos vírus mais ampla. O aparecimento dos métodos independentes de um conhecimento prévio das sequências a amplificar, permitiram começar a analisar o conteúdo genético diretamente a partir de amostras ambientais, recorrendo a reações de amplificação aleatórias, ou em que a amplificação pretendida depende da utilização de *primers* que hibridam com moléculas artificiais (*linkers*), ligadas aos extremos das sequências a amplificar. Destas, metodologias como SISPA (do inglês *sequence-independent single primer amplification*), VIDISCA (do inglês *Virus Discovery cDNA-AFLP*), RACE (do inglês *Rapid Amplification of cDNA Ends*), amplificação de DNA baseada na polimerase do fago phi-29 e metodologias baseadas em microarranjos (*microarrays*) (Ambrose e Clewley, 2006), são alguns exemplos. Porém, a existência de sequências virais maioritárias, por oposição aos vírus que serão minoritários, representou uma limitação à identificação destes últimos.

Neste sentido, paralelamente ao desenvolvimento destes métodos, surgiu uma revolução na análise metagenómica, decorrente da expansão da utilização de metodologias de NGS (do inglês *Next Generation Sequencing*), as quais permitiram solucionar a grande maioria dos problemas encontrados até então, e, sem as quais a descoberta de grande parte dos vírus na última década, incluindo os específicos de insetos, não teria sido possível. A tecnologia de NGS engloba uma série de novas metodologias de sequenciação, não baseada no método de Sanger (1977) mas sim em sistemas que permitem detetar milhares de sequências raras ou minoritárias, pelo facto de gerar milhares de leituras a partir de uma única amostra (Mokili *et al.*, 2012; Hall, 2007). Trata-se de um conjunto de abordagens tecnológicas que permitem identificar várias sequências genómicas de forma rápida, precisa, pouco dispendiosa e com um elevado rendimento. Embora este método ainda não tenha sido diretamente utilizado para analisar o viroma de mosquitos, foi utilizado para sequenciar vírus de mosquitos desconhecidos, mas previamente isolados em cultura (Junglen e Drosten, 2013).

O aparecimento de novas metodologias moleculares, nomeadamente a NGS, tem permitido aprimorar o conhecimento sobre a diversidade de vírus existente, entre os quais novos vírus específicos de insetos, inferir algumas das suas características moleculares, tais como as semelhanças com outros agentes patogénicos e, também, clarificar as relações filogenéticas com outros vírus, permitindo especular sobre as suas origens. Embora o desenvolvimento destas técnicas tenha contribuído bastante para

1. Introdução

dinamizar a investigação na área da virologia, não substituiu na totalidade, as técnicas mais tradicionais, pois estas continuam a ser utilizadas paralelamente, e de forma complementar, para a descoberta de novos vírus, como forma de definir o seu tropismo, a localização intracelular e propriedades dos componentes virais (Firth e Lipskin, 2013).

1.4. O género *Negevirus*

1.4.1. Caracterização filogenética dos negevírus

O género *Negevirus* foi pela primeira vez descrito em 2013, tendo sido proposto por Nikos Vasilakis e seus colaboradores como um novo grupo taxonómico de vírus específicos de insetos (mosquitos e flebótomos; ver secção seguinte), com uma ampla distribuição geográfica (Vasilakis *et al.*, 2013). Numa abordagem inicial, análises filogenéticas efetuadas a partir de um segmento da sequência genómica de negevírus, correspondente ao domínio que codifica a polimerase viral, sugeriram a existência de uma relação filogenética entre negevírus e o vírus da leprose dos citrinos do tipo citoplasmático (CiLV-C do inglês *citrus leprosis virus cytoplasmic type*), o qual é transmitido por ácaros da espécie *Brevipalpus phoenicis* e provoca doença severa em árvores de citrinos. Análises filogenéticas posteriores, efetuadas com base em alinhamentos de sequências proteicas, segundo diferentes abordagens algorítmicas e envolvendo pelo menos, duas regiões diferentes do genoma viral, revelaram a existência de seis linhagens virais distintas designadas de Negev, Ngewotan, Piura, Loreto, Dezidougou e Santana, distribuídas por três grupos monofiléticos principais (caixas a ponteadas, figura 2), mas que, aparentemente, partilham um ancestral comum, e filogeneticamente distintos da linhagem que inclui os vírus CiLV-C (Figura 2).

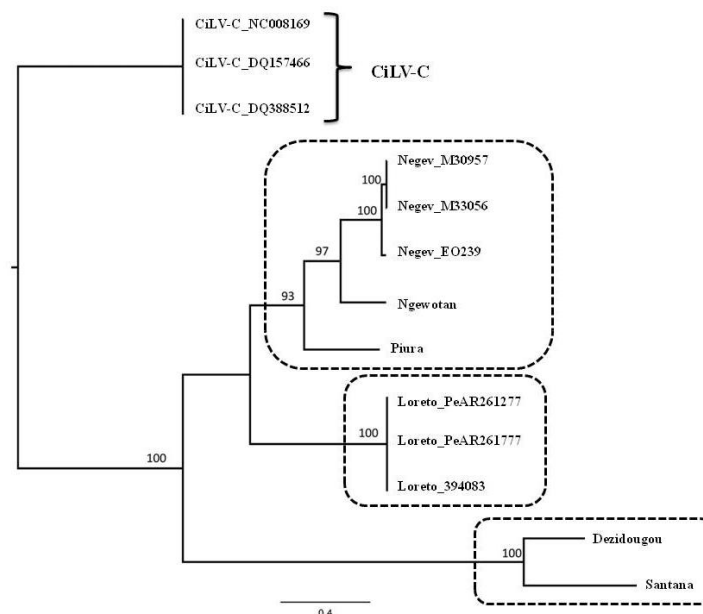


Figura 2 – Árvore filogenética construída com base no critério de máxima verossimilhança revelando a existência de seis linhagens distintas de negevírus, filogeneticamente distintas do CiLV-C. A região do genoma alinhado corresponde ao domínio funcional da maior das proteínas virais (ORF1), que lhe confere atividade de polimerase de RNA dependente de RNA (RdRp), de cada uma das sequências analisadas. Adaptado de Vasilakis *et al.*, 2013.

Desde a primeira publicação relativa à descrição deste presumível novo género, vários estudos têm sido efetuados no sentido de aprofundar o conhecimento sobre o mesmo. Como tal, recentemente, e até à data da publicação do presente trabalho, foram isolados outros três vírus pertencentes a este género e designados de vírus Wallerfield (WALV) (Auguste *et al.*, 2014), Tanay (TANAV) (Nabeshima *et al.*, 2014) e Goutanap (GANV) (Kallies *et al.*, 2014) todos filogeneticamente próximos dos vírus Dezidougou e Santana, formando um único grupo monofilético com estes.

1.4.2. Distribuição geográfica e diversidade de hospedeiros

Os vírus incluídos no género *Negevirus* apresentam, não só uma elevada distribuição geográfica, mas também uma vasta diversidade de hospedeiros. Até à data, já foram encontrados vírus pertencentes a este género em vários países (identificados na figura 3), tais como Brasil, Perú, Estados Unidos da América, Costa do Marfim, Israel,

1. Introdução

Indonésia (Vasilakis *et al.*, 2013) e, mais recentemente em Trindade (Auguste *et al.*, 2014), nas Filipinas (Nabeshima *et al.*, 2014), em Portugal (Ferreira *et al.*, 2013) e no México (Kallies *et al.*, 2014).



Figura 3 – Distribuição geográfica mundial de negevírus isolados entre 2013 e 2014. Em laranja estão identificados os países onde já se verificou a presença de negevírus, isolados a partir de mosquitos e flebótomos. A área circular corresponde a Israel, local onde foi isolado o vírus Negev pela primeira vez. Fonte: http://www.amcharts.com/visited_countries/

A origem da denominação do género *Negevirus* está relacionada com o facto do vírus Negev ter sido o primeiro membro proposto, isolado a partir de mosquitos *An. coustani* capturados no deserto de Negev em Israel, no ano de 1983, e por aparentar ser o negevírus que apresenta uma maior distribuição geográfica.

Relativamente à sua gama de hospedeiros, para além do isolamento de negevírus a partir de mosquitos da espécie *An. coustani*, já foram igualmente isolados negevírus em mosquitos de outras espécies tais como *Cx. coronator*, *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. vishnui*, *An. albimanus*, *Ae. aegypti* (Vasilakis *et al.*, 2014), *Cx. declarator*, (Auguste *et al.*, 2014), *Armigeres* spp. (Nabeshima *et al.*, 2014), *Mansonia* spp., *Psorophora* spp., *Wyeomyia* spp., *Trichoprosopon* spp., *Toxorhynchites* spp., *Coquillettidia* spp. (Kallies *et al.*, 2014), e em flebótomos do género *Lutzomyia* (Vasilakis *et al.*, 2014). Em Portugal foi possível coisolar negevírus, em cultura de células de inseto, conjuntamente com um flavivírus específico de insetos, OCFV_{PT} (do inglês *Ochlerotatus caspius*

flaviivir from Portugal), a partir de mosquitos da espécie *Oc. caspius* (Ferreira *et al.*, 2013).

À semelhança dos demais vírus específicos de insetos, os negevírus não têm a capacidade de infetar células de mamífero, mas, em contrapartida, nas células em que replicam *in vitro* provocam rapidamente um efeito citopático exuberante, sendo que o seu título nos sobrenadantes de culturas de células de *Ae. albopictus* (correspondentes a linhagens celulares C6/36 e C7/10) infetadas pode atingir 10^{10} p.f.u./mL (do inglês *plaque forming unit*), entre 12 a 24 horas após a infeção (Vasilakis *et al.*, 2013).

1.4.3. Manutenção na Natureza

A forma como os negevírus são mantidos na natureza entre os seus hospedeiros permanece ainda por esclarecer, apesar de já terem sido discutidas algumas hipóteses. Uma das primeiras a ser sugerida especula sobre a possibilidade destes vírus serem transmitidos de forma vertical, dado serem necessários elevados títulos virais (10^7 - 10^9 p.f.u./mL) para infetar mosquitos por via oral através, por exemplo, de uma refeição sanguínea (Vasilakis *et al.*, 2013). Porém, essa hipótese foi recentemente contrariada por Nabeshima *et al.* (2014) cujos resultados revelaram que TANAV, isolados de mosquitos de diferentes géneros *Culex* e *Armigeres*, colhidos ao mesmo tempo no mesmo local, apresentaram sequências de RNA praticamente idênticas, sugerindo que a transmissão de alguns negevírus, como TANAV, possa ser efetuada horizontalmente entre diferentes espécies de mosquitos.

1.4.4. Organização genómica

O genoma dos negevírus é constituído por uma molécula de RNA de cadeia simples e polaridade positiva (ssRNA⁺), com um tamanho que varia entre 9 e 10 kb, e que apresenta três grelhas de leitura abertas (ORF, do inglês *open reading frames*), a grande maioria separadas entre si por regiões intergénicas (Figura 4A). O genoma viral está delimitado por regiões não traduzidas (UTR, do inglês *untranslated regions*) nas

1. Introdução

extremidades 5' e 3' e é caracterizado por possuir uma cauda poliadenilada [poli(A)] na extremidade 3'.

A ORF cujo início se localiza junto ao extremo 5' do genoma viral, designada ORF1, cobre mais de dois terços do genoma viral e, aparentemente, codifica uma poliproteína não-estrutural, na qual podem ser identificados quatro domínios funcionais (Figura 4B) (análise através de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>). Dois dos domínios identificados caracterizam metilases, e poderão estar envolvidos na metilação do *cap* viral. Uma das metilases (aproximadamente entre as posições 562-1620 relativas à sequência de referência Negev M30957) sugere ser de origem viral e, aparentemente, é encontrada numa vasta gama de vírus com genoma de ssRNA, como bromovírus e closterovírus. A outra (aproximadamente entre as posições 2743-3306 relativas à sequência de referência Negev M30957), é sugestiva de pertencer ao domínio típico de metilases que estão implicadas na metilação de RNA ribossomal, sendo encontrada essencialmente em bactérias. Apesar da presença de metilases associadas à formação de um *cap* viral noutros vírus possa sugerir que a iniciação da tradução de negevírus se processa mediante a presença de *cap* viral (do inglês *Cap-dependent translation initiation*), foram detetadas na região 5' UTR do genoma de negevírus sequências que poderão funcionar como IRES (do inglês *Internal Ribosome Entry Site*; Gorchakov *et al.*, 2014) as quais são capazes de mediar a iniciação da tradução independente de *cap*, contrariando, pelo menos parcialmente, a primeira hipótese. Além dos domínios de metilases foram identificados dois outros domínios, um deles, típico de um conjunto de helicases de RNA de origem viral (aproximadamente entre as posições 4414-5202 relativas à sequência de referência Negev M30957), caracterizado por assumir diferentes papéis durante a replicação viral e outro, correspondente a um domínio de polimerase de RNA dependente de RNA (RdRp do inglês *RNA-dependent RNA polymerase*), localizado no extremo carboxilo da proteína ORF1 (aproximadamente entre as posições 5953-7218 relativas à sequência de referência Negev M30957). No entanto, a identificação dos referidos quatro domínios resultou de análises *in silico* e de uma analogia com outros vírus, permanecendo por confirmar efetivamente a sua funcionalidade. As restantes duas ORF, designadas por ORF2 e ORF3, possuem um tamanho menor, e codificam proteínas nas quais se podem identificar hélices transmembranares, que podem variar em número e disposição

consoante a estirpe de negevírus analisada, sugerindo codificar glicoproteínas do invólucro viral (Auguste *et al.*, 2014; Vasilakis *et al.*, 2013).

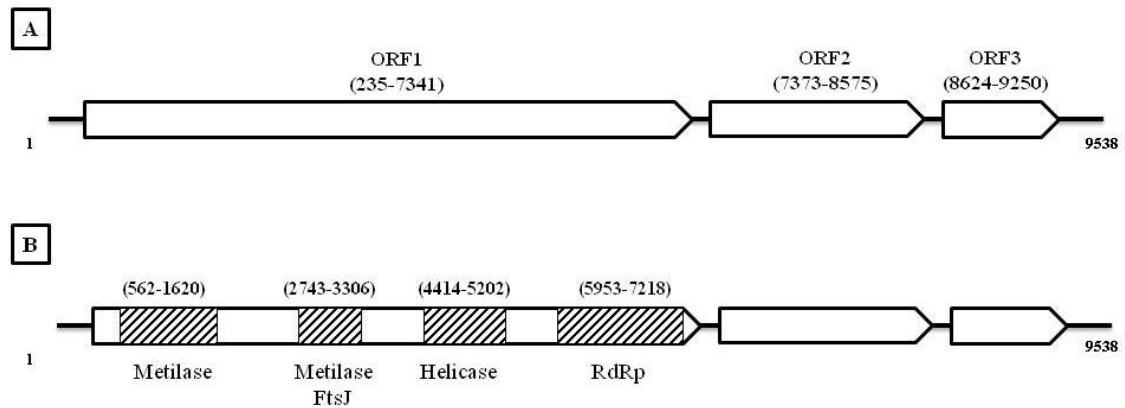


Figura 4 – Organização genómica dos negevírus: posição das grelhas de leitura aberta (A) e domínios proteicos conservados (B). Adaptado de Vasilakis *et al.*, 2013. Nota: as coordenadas são referentes ao genoma do vírus Negev M30957.

1.5. Características da replicação de vírus de RNA de polaridade positiva

Os vírus com genoma de ssRNA⁺ pertencem à classe IV da classificação de Baltimore (1971), uma das maiores classes genéticas de vírus, na qual estão incluídos aqueles que possuem genomas lineares com a mesma polaridade do mRNA viral e que, aparentemente, replicam usando um intermediário de RNA de polaridade dupla (dsRNA). Dada esta característica, o genoma destes vírus tem a capacidade de ser traduzido imediatamente após a sua entrada no citoplasma das células infetadas, sendo infeccioso por si mesmo. As proteínas virais que formam, ou se associam, ao complexo replicativo são as primeiras a serem traduzidas (Figura 5A) e incluem as que recrutam o genoma viral para servir de matriz à replicação e transcrição (Figura 5B). A replicação é efetuada por uma RdRp não transportada no virião (mas sim sintetizada *de novo* nas células infetadas), recorrendo a um RNA antigenómico (ssRNA⁻), o qual serve de matriz para a replicação de novos genomas virais (Boon *et al.*, 2010).

1. Introdução

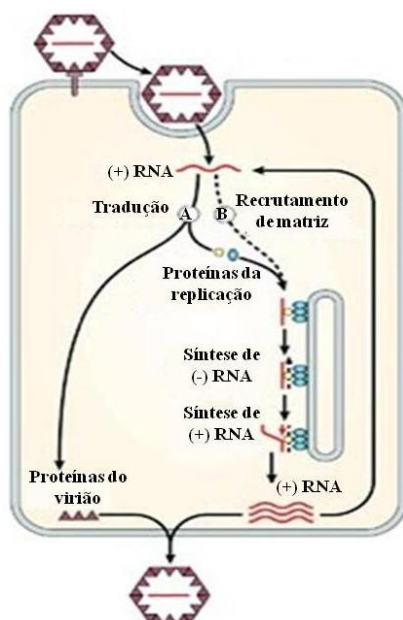


Figura 5 – Replicação de vírus com genoma de ssRNA⁺. Após a entrada dos viriões por endocitose, o genoma viral é libertado para o citoplasma onde ocorre a tradução das proteínas virais (A). Proteínas virais recém-traduzidas, associadas ao complexo replicativo, recrutam o genoma viral na formação de um intermediário de dsRNA, o qual serve de matriz à replicação e transcrição do genoma destes vírus (B). Adaptado de Ahlquist, 2006.

O ciclo replicativo dos vírus de ssRNA⁺ ocorre exclusivamente no citoplasma, e são já inúmeros os estudos que têm vindo a revelar que a replicação do genoma viral está fortemente associada a um extenso rearranjo nas membranas intracelulares (Denison, 2008; Miller e Krijnse-Locker, 2008). Análises realizadas com recurso à microscopia eletrónica revelaram que vários vírus de ssRNA⁺ induzem uma alteração na conformação das membranas celulares de forma a darem origem a compartimentos específicos. Esta compartimentação, para além de permitir uma concentração dos fatores de replicação de origem viral e proteínas do hospedeiro (sugerindo contribuir para maximizar a eficiência no processo), permite também, que a síntese de RNA ocorra fisicamente separada da tradução. Além disso, estas estruturas permitem criar um ambiente que confere a proteção do complexo replicativo da degradação por nucleases celulares e proteases, implicadas nas respostas de defesa do hospedeiro à presença de dsRNA, tais como as mediadas pela interferência ou por RNA de interferência (RNAi) (Schwartz *et al.*, 2002).

As principais alterações estruturais nos compartimentos endomembranares das células identificadas durante a replicação de vários vírus de ssRNA⁺ são essencialmente de dois tipos: formação de esférulas e de vesículas de membrana dupla. As esférulas são estruturas aproximadamente esféricas, com origem em invaginações de membranas de diferentes organelos celulares, tais como o retículo endoplasmático (ER do inglês *endoplasmatic reticulum*). A formação das esférulas resulta de uma interação entre o genoma viral, proteínas virais e possivelmente algumas proteínas celulares, sendo que o seu interior contém complexos de replicação viral e RNA viral sintetizado *de novo*. A importação de ribonucleótidos para o interior das esférulas e a exportação de RNA viral sintetizado *de novo* para o citoplasma parece ser efetuada através de uma estrutura em forma de canal oco, denominada, na literatura, de *neck-like*, que resulta das invaginações aquando da formação das esférulas, o qual delimita um poro que permite que o interior da esférula contacte diretamente com o citoplasma.

Um dos vírus que melhor exemplifica a formação de esférulas derivadas de membranas internas e externas do ER é o vírus do mosaico de bromeliáceas (BMV do inglês *brome mosaic virus*), um bromovírus que infeta plantas (Schwartz *et al.*, 2002) (Figura 6A). Porém, a formação de esférulas enquanto compartimento no qual decorre a replicação viral não tem uma origem restrita ao ER. O vírus *flock house* (FHV do inglês *flock house virus*) é um nodavírus que infeta células de inseto, e embora tenha um hospedeiro distinto do BMV, possui um mecanismo de replicação semelhante ao mesmo (Miller e Ahlquist, 2002). A replicação do FHV ocorre na mitocôndria, através da formação de numerosas esférulas de replicação, a partir da membrana externa do referido organelo (Figura 6B).

1. Introdução

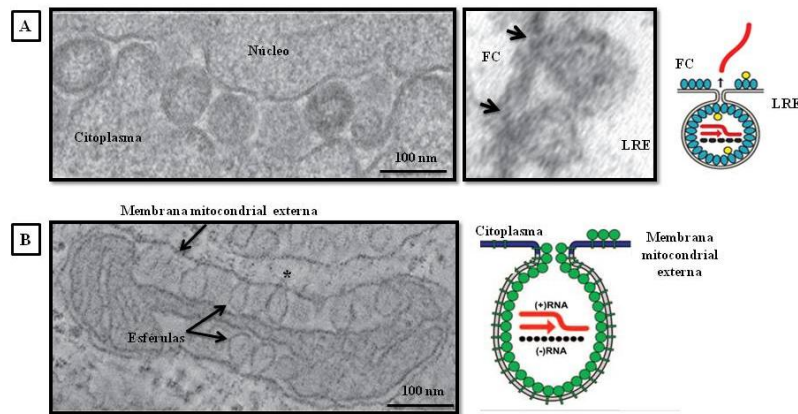


Figura 6 – Imagens de microscopia eletrónica das alterações membranares caracterizadas pela formação de esférulas durante a replicação dos vírus BMV e FHV e respetivos diagramas dos complexos replicativos. (A) O BMV induz a formação de esférulas associadas à membrana do ER. É possível verificar que as esférulas se formam a partir do folheto citoplasmático (FC) da membrana do ER em direção ao lúmen do mesmo (LRE). (B) O FHV induz a formação de esférulas por invaginação da membrana mitocondrial externa, algumas com estruturas *neck-like* visíveis (*). Adaptados de Schwartz *et al.*, 2002 (A) e Kopek *et al.*, 2007 (B).

Além destes dois exemplos, o vírus da dengue (DENV do inglês *dengue virus*) representa também, um exemplo claro de um vírus que provoca alterações membranares durante a replicação viral. A infeção por este flavivírus é caracterizada por induzir a formação de diversas estruturas a partir das membranas do ER, tais como conjuntos de vesículas (VP do inglês *vesicle packs*), membranas convolutas (CM do inglês *convoluted membranes*) e membranas associadas à montagem e saída de viriões (Figura 7A) (Welsch *et al.*, 2009). Neste caso em particular, parece existir uma interligação em contínuo entre estruturas especificamente implicadas na replicação do genoma viral e estruturas implicadas na morfogénese e saída de viriões, constituindo uma rede membranar derivada do ER (*ER – derived membrane network*) (Figura 7B). Nesta rede membranar, as vesículas internas constituintes dos VP são oriundas de invaginações da membrana externa do ER, possuindo uma conexão entre o interior das mesmas e o citoplasma através de poros semelhantes aos das vesículas de replicação dos BMV e FHV. Embora no caso do DENV, o número de estruturas associadas à replicação viral seja superior às que são evidenciadas para o BMV e FHV, a metodologia replicativa é muito semelhante.

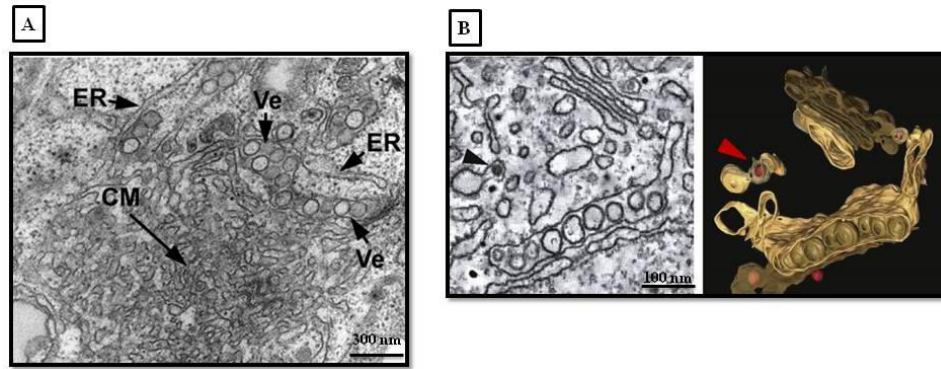


Figura 7 – Imagens de microscopia eletrónica, a duas e três dimensões, das alterações membranares associadas ao retículo endoplasmático, induzidas pela replicação do DENV. (A) O DENV induz a formação de conjuntos de vesículas (Ve) e membranas convolutas (CM) ao redor das membranas do retículo endoplasmático (ER). (B) Presença de rede membranar derivada do ER. As setas, preta e vermelha, indicam partículas virais em associação a estruturas de montagem e saída de viriões. *Adaptado de Welsch et al., 2009.*

Para além da formação de esférulas, outra remodelação do sistema endomembranar registada durante a replicação de determinados vírus, é a formação de vesículas de membrana dupla (DMV do inglês *double-membrane vesicles*), identificadas como sendo locais de replicação viral, devido à presença de intermediários replicativos (dsRNA). Este tipo de alteração membranar é exemplificada pelo vírus do síndrome respiratório agudo severo (SARS-V do inglês *severe acute respiratory syndrome virus*), dado que durante a replicação, este vírus induz a formação, não só de um rearranjo misto de VP e CM mas também, de vesículas aparentemente recobertas de uma dupla membrana lipídica (Figura 8) (Knoops *et al.*, 2008). A formação de DMV tem origem, essencialmente, em membranas do ER, e parecem estar interligadas entre si através de estruturas tubulares (Figura 8 I, II e III).

1. Introdução

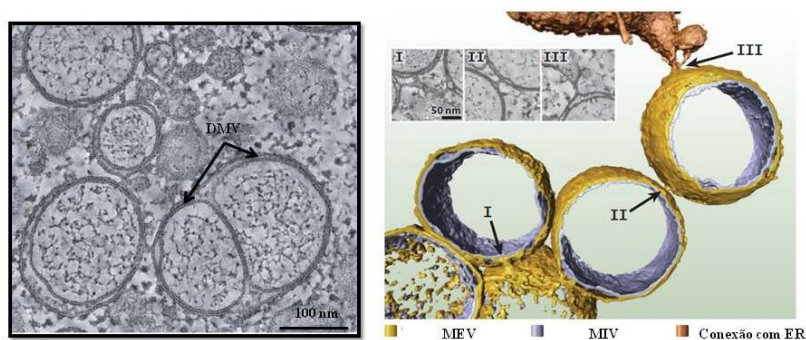


Figura 8 – Imagens de microscopia eletrónica, a duas e três dimensões, das alterações membranares associadas ao retículo endoplasmático, induzidas pela replicação do SARS-V. A replicação do vírus SARS induz a formação de DMV, com membranas internas (MIV) e externas (MEV) aparentemente interligadas entre si através de estruturas tubulares I, II e III), e a sua ligação ao retículo endoplasmático (ER). Adaptado de Knoops *et al.*, 2008.

Distintamente do que acontece nas vesículas replicativas de BMV, FHV e DENV, as vesículas do SARS-V não parecem apresentar poros de conexão entre o interior das mesmas e o citoplasma, permanecendo por esclarecer os mecanismos de importação de ribonucleótidos e exportação de RNA sintetizado *de novo*. Uma das possibilidades é que o transporte seja efetuado por canais proteicos, devido à presença de múltiplos domínios transmembranares numa grande extensão do genoma do SARS-V. Além disso, estudos revelaram que a presença desses domínios é responsável pela indução de DMV e pela ancoragem do complexo replicativo às mesmas (Oostra *et al.*, 2008).

1.6. Objetivos

No âmbito do trabalho experimental, que foi desenvolvido tendo em vista a obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biomédicas, foi proposta a presente dissertação, a qual teve como objetivos a deteção, isolamento e caracterização genética de novos negevírus de mosquitos colhidos no sul de Portugal, a definição da sua gama de hospedeiros e o estudo das estratégias de replicação dos mesmos usando células de inseto mantidas em cultura.

2|

MATERIAL E MÉTODOS

2. Material e Métodos

2.1. Origem e captura de mosquitos

Neste estudo foram analisados mosquitos (fêmeas) adultos capturados no sul de Portugal (distrito de Faro), entre os meses de Abril e Outubro, dos anos 2009 e 2010 (Costa, 2010). A partir de 26 locais de origem, os mosquitos foram capturados em 23 pontos de colheita, localizados em diferentes localidades incluídas em três regiões principais: região oeste com pontos de colheita distribuídos por Esteveira (n=2), Odiáxere (n=2), Portimão (n=1) e Lagoa (n=1); região centro com pontos de colheita distribuídos por Almancil (n=1), Corgo da Zorra (n=2), Dunas Douradas (n=1), Estoi (n=2), Garrão (n=1), Pechão (n=2), Quinta das Salinas (n=1) e Quinta do Lago (n=1); e região este cujos pontos de colheita se localizaram em Tavira (n=2), Junqueira (n=1) e Castro Marim (n=3). Dentro de cada região, a distância máxima entre os pontos de colheita foi de 2,27 Km, 17,08 Km e 20,41 Km, respetivamente, para as regiões oeste, centro e este, que estavam separadas por 69,38 Km (oeste-centro) e 57,38 Km (centro-este). Todos os pontos de colheita ficaram localizados a uma distância máxima de 8,30 Km da costa. Adicionalmente, alguns mosquitos foram capturados na região da Comporta, mais especificamente na localidade da Gâmbia, situada no distrito de Setúbal, aproximadamente a 50 Km de Lisboa. A seleção e distribuição dos pontos de colheita foi efetuada de forma arbitrária pelo Doutor Paulo Almeida e restante equipa de colaboradores.

Os mosquitos foram coletados mediante o uso de armadilhas luminosas do tipo CDC (Sudia e Chamberlain, 1962), utilizando gelo seco como fonte de CO₂ (Newhouse *et al.*, 1966), colocadas estrategicamente fora dos abrigos dos animais ou na sua proximidade, durante um período de pelo menos 12 horas. Alternativamente, alguns dos mosquitos foram capturados em locais de repouso mediante a utilização de aspiradores mecânicos manuais. Todos os exemplares foram mantidos vivos e refrigerados até serem transportados para o laboratório de Entomologia do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT) onde foram, de imediato, congelados a -80°C. A identificação morfológica dos mosquitos foi efetuada sobre uma placa de frio, com o auxílio de um esteromicroscópio, utilizando como referência a chave de Ribeiro e Ramos (1999) e tendo por base os *taxa* de distribuição Europeia referida por Snow e Ramsdale (1999). Posteriormente, os exemplares foram agrupados em vários lotes de

acordo com a espécie a que pertenciam, a região de colheita e a data em que foram capturados.

No total foram analisados 2.586 mosquitos, distribuídos por 56 lotes e 10 espécies: *Oc. caspius* (n=17), *Cx. theileri* (n=15), *Cx. pipiens* (n=9), *An. atroparvus* (n=6), *Cx. univittatus* (n=3) e *Cx. laticinctus* (n=2). As espécies *An. algeriensis*, *Culiseta annulata*, *Cu. longiareolata* e *Ae. detritus* ficaram representadas por um lote cada. Cada lote foi composto por um número de mosquitos que variou entre 14 e 62.

2.2. Produção de macerados de mosquitos

Os macerados de mosquitos que compuseram cada um dos lotes analisados foram obtidos por fragmentação mecânica dos insetos com o auxílio de esferas de vidro, na presença de óxido de alumínio, segundo o protocolo descrito por Huang *et al.* (2001). Sucintamente, cada lote de mosquitos, independentemente do número de exemplares que continha, foi triturado com o auxílio de um vórtex após a adição de 1,5 mL de PBS (*Phosphate-Buffered Saline*; tampão fosfato salino) contendo 4 % de FBS (*Fetal Bovine Serum*; soro bovino fetal), 0,25 g de óxido de alumínio e 5 esferas de vidro (com aproximadamente 3 mm de diâmetro). Os macerados foram centrifugados a 14.500 g (10 minutos a 4°C) e o sobrenadante foi recolhido e esterilizado por filtração através de filtros PVDF (*polyvinylidene difluoride*) Millex® (Millipore, E.U.A.). As amostras foram armazenadas a -80°C até uso posterior.

2.3. Manipulação de linhas celulares infetadas e não infetadas

2.3.1. Cultura de células C6/36 e isolamento viral

Foram utilizadas culturas de uma linha celular denominada C6/36 (ATCC® CRL-1660™), derivada de células larvares de *Ae. albopictus*. As células foram mantidas a 28°C em meio de cultura Leibovitz L-15 (Lonza, E.U.A.) suplementado com 10 % de FBS inativado por aquecimento (Lonza, Bélgica), 2 mM de L-glutamina (Gibco BRL, E.U.A.), estreptomicina (100 µg/mL), penicilina (100 U/mL), e meio de

2. Material e Métodos

triptose-fosfato concentrado 1X (*AppliChem GmbH*, Alemanha). A passagem das células foi efetuada uma vez por semana, numa diluição de 1:10, diretamente através da ressuspensão (após destacamento, por raspagem, da superfície sólida do frasco de cultura) das células em meio de cultura novo. Esta linha celular foi utilizada não só para isolar potenciais vírus, mas também como hospedeira de amplificação dos mesmos, tendo em vista estudos de replicação viral ou, simplesmente, produção de lisados de alto título.

O isolamento viral foi iniciado com a infeção de uma monocamada subconfluente de células C6/36 em frascos de cultura T₂₅ (*Nunc*, Dinamarca) com um volume de 500 µL de macerado de mosquito esterilizado por filtração (tal como descrito na secção 2.2.), diluído em igual volume de PBS. Após a adsorção dos vírus às células, que ocorreu durante 2 horas, com agitação suave a 28°C, o inóculo foi retirado, as células foram lavadas com PBS e foi adicionado um volume de 5 mL de meio de cultura *Leibovitz* L-15, suplementado com 2 % de FBS. As culturas celulares foram mantidas numa atmosfera a 28°C até um máximo de 96 horas.

Durante o tempo de incubação as células foram regularmente observadas utilizando um microscópio invertido, e os efeitos citopáticos (CPE, do inglês *Cytopathic effect*) registados em fotografias digitais. Em função da magnitude do CPE observado, foram efetuadas duas passagens cegas com períodos de 96 horas cada, segundo o protocolo acima referido e a partir de 500 µL de cada sobrenadante de cultura. Os sobrenadantes e os sedimentos das culturas infetadas foram separados por centrifugação (10 minutos a 250 g), recolhidos e conservados a -80°C até futura utilização.

2.3.2. Cultura de células HEK293T

Ao longo deste trabalho foi também utilizada uma linha celular contínua designada HEK293T (ATCC® CRL-11268TM), composta por células de rim embrionário humano. Estas células foram mantidas a 37°C, numa atmosfera húmida com 5 % de CO₂, em meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*; *Lonza*, E.U.A.) suplementado com 10 % de FBS, 1 mM de L-glutamina (*Gibco BRL*, E.U.A.), estreptomicina 100 µg/mL, penicilina 100 U/mL, 1 mM de piruvato de sódio e

0,1 mM de aminoácidos não essenciais (*Sigma-Aldrich*, E.U.A.). A passagem das células foi efetuada de três em três dias, numa diluição de 1:10, por ressuspensão mecânica das células em meio de cultura novo, tendo este sido mudado dois dias após cada passagem.

2.3.3. Transfecção de células HEK293T e de células C6/36

O protocolo de transfecção das linhas celulares HEK293T e C6/36 foram adaptados, respetivamente, de Dong *et al.* (2007) e Ogay *et al.* (2006). Para efetuar ambas as transfecções foram utilizadas placas de 12 alvéolos, nas quais foram semeadas células em monocamada sobre lamelas de vidro (12x12 mm), de acordo com as condições de cada cultura descritas nas secções 2.3.1. e 2.3.2., numa concentração de $2,5 \times 10^5$ células por alvéolo.

Sucintamente a técnica de transfecção das células HEK293T consistiu na adição de 2 µg de DNA plasmídico a 200 µL de meio de cultura DMEM não suplementado com FBS, seguido da sua mistura por inversão. Posteriormente foi adicionada polietilenimina (PEI; 1 mg/mL, pH=7), numa razão de massa 1:1,5 (DNA:PEI), e a mistura foi mantida 10 minutos à temperatura ambiente. Após substituição do meio de cultura das células a transfetar por DMEM suplementado com 2 % de FBS, adicionou-se a mistura contendo os complexos DNA:PEI, gota a gota, à monocamada de células HEK293T. Estas foram incubadas a 37°C em atmosfera húmida com 5 % de CO₂ durante 48 horas.

Relativamente à transfecção da linha celular C6/36, o protocolo foi semelhante, excetuando alguns passos intermédios. Resumidamente, a 200 µL de uma solução de NaCl (150 mM) foram adicionados 2 µg de DNA plasmídico e, após agitação, a mistura foi incubada num banho seco a 72°C (7 minutos) para esterilizar a solução contendo as moléculas de DNA a serem utilizadas na transfecção pretendida. Findo o tempo de incubação, a mistura arrefeceu até à temperatura ambiente. Posteriormente foi adicionada PEI (1mg/mL, pH=7) numa razão de massa 1:1,5 e a mistura foi mantida à temperatura ambiente durante 10 minutos. O meio de cultura das células C6/36 a transfetar foi substituído por *Leibovitz* L-15 suplementado com 2 % de FBS e a mistura

2. Material e Métodos

DNA:PEI foi adicionada, gota a gota, à monocamada celular. A placa de cultura foi centrifugada a 280 g (5 minutos) e as células incubadas numa atmosfera a 28°C durante 48 horas.

Terminado o tempo de incubação, as células de ambas as transfeções foram fixadas através da adição de uma solução de formaldeído 4 % em PBS (v/v), de modo a que a concentração final atingisse os 2 % (v/v). Após uma incubação à temperatura ambiente (20 minutos) as células foram lavadas em duplicado com uma solução de PBS. As lamelas foram montadas sobre lâminas utilizando meio de montagem *Fluoroshield*TM (*Sigma-Aldrich*, E.U.A.) e as preparações visualizadas num microscópio de fluorescência MOTIC[®], num comprimento de onda entre 450 e 490 nm. As fotografias de fluorescência foram captadas com o auxílio de uma câmara *MOTICAM 2300 3.0 MP*, anexa ao microscópio.

2.4. Cinética da replicação viral

O estudo da cinética da replicação do vírus OCNV₁₇₄ (ver secções seguintes) em células C6/36 foi efetuado mediante a utilização de alíquotas de sobrenadantes de culturas celulares, colhidos a diferentes tempos após infeção (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 8 horas) (tal como descrito na secção 2.3.1.) sendo que o tempo zero (0 horas) correspondeu a um sobrenadante colhido após 2 horas de adsorção com a suspensão viral, lavagem das células e adição de meio de cultura *Leibovitz* L-15, suplementado com 2% de FBS. O genoma viral foi tentativamente detetado através da sua amplificação parcial com os *primers* F0 e R0 (Tabela 1), a partir do RNA total extraído de cada sobrenadante (ver secção 2.8.), utilizando a polimerase *Phusion*TM *High-Fidelity DNA Polymerase* (*Thermo Fisher Scientific*, E.U.A.) de acordo com o protocolo descrito em 2.11.1., e depois do RNA ter sido retrotranscrito como descrito na secção 2.9.

Para além das amplificações efetuadas por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) convencional foram também efetuadas amplificações por PCR em tempo real, segundo o protocolo descrito na secção 2.11.2., utilizando o mesmo par de *primers*.

2.5. Avaliação da indução de apoptose

O protocolo utilizado para avaliar a indução da apoptose durante a replicação viral consistiu na visualização da presença de fragmentos de DNA resultantes da clivagem da cromatina ao longo de uma cinética de infeção, com recurso à análise direta do perfil eletroforético de extratos de DNA genómico total. Para tal, monocamadas subconfluentes de células C6/36 foram infetadas com 500 µL de sobrenadante de cultura do OCNV₁₇₄, de acordo com o protocolo descrito na secção 2.3.1. e, a diferentes tempos após infeção (24, 48 e 72 horas), foram recolhidas as células infetadas. Como controlo negativo, foram utilizadas células não infetadas mantidas durante 24, 48 e 72 horas em cultura, nas mesmas condições, e um tempo considerado 0 horas, cujo tratamento foi igual ao tempo zero da cinética, substituindo a suspensão viral por meio de cultura com 2 % de FBS sem vírus.

Os extratos de DNA genómico total foram preparados através da ressuspensão inicial do sedimento celular em 500 µL de tampão de lise [10 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA (*Ethylene Diamine Tetracetic Acid*; ácido etilenodiaminotetracético), 200 mM NaCl, 0,2 % SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*; dodecil sulfato de sódio), pH=8,5], seguida de uma incubação a 60°C durante 5 minutos, findos os quais foram adicionados 2,5 µL de uma solução de proteinase K (25 mg/mL). A mistura ficou a incubar a 60°C (1 hora) com agitações periódicas. Findo este tempo de incubação, foi adicionado 1 volume de uma mistura de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (nas proporções de 25:24:1; *Sigma-Aldrich*, E.U.A) e a mistura foi homogeneizada por agitação. O sobrenadante foi recuperado por centrifugação a 14.500 g (5 minutos) e o DNA precipitado pela adição de acetato de sódio (3M) e glicogénio concentrado (20 mg/mL) nas razões de 1:10 e 1:100, respetivamente, ao volume de suspensão contendo o DNA. Posteriormente, foi adicionado 1 volume de isopropanol e o DNA foi recolhido por centrifugação a 14.500 g (30 minutos). O sedimento contendo o DNA foi lavado com etanol (70 %), seco e ressuspendido em 50 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl pH=8,0, 1 mM EDTA) suplementado com RNase (100 µg/mL).

A presença de fragmentos de DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v), em tampão TAE 0,5X (40 mM Tris-Acetato, 1 mM EDTA, pH=0,8), na presença de brometo de etídio (0,5 µg/mL). A migração decorreu com corrente constante de 50 V durante 3 horas.

2. Material e Métodos

2.6. Microscopia eletrónica de transmissão

As culturas celulares C6/36 infetadas com OCNV₁₇₄, que demonstraram um elevado CPE ao fim de 48 horas de infeção, foram analisadas por microscopia eletrónica de transmissão (TEM; do inglês *Transmission Electron Microscopy*). Para tal, as células infetadas foram recolhidas por raspagem com o auxílio do êmbolo de uma seringa, fixadas sequencialmente com uma solução de glutaraldeído a 3 % e tetróxido de ósmio em tampão cacodilato, seguida de acetato de uranilo em água bi-destilada. O aumento da concentração de etanol promoveu a desidratação celular. Após a passagem por óxido de propileno, as amostras foram embebidas em resina *Epon-Araldite* utilizando *SPI-Pon* como alternativa ao *Epon 812*. As secções foram produzidas com instrumentos de corte de vidro ou diamante e permaneceram numa solução aquosa contendo acetato de uranilo a 2 % e citrato de *Reynold's*. O estudo e registo fotográfico das secções foi efetuado com recurso ao microscópio eletrónico *JEOL 100-SX*.

2.7. Análise de proteínas solúveis totais por SDS-PAGE

A análise de proteínas solúveis totais foi efetuada com recurso à sua separação por eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE; *SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis*) utilizando o sistema de Laemmli (1970). Os géis de concentração foram preparados de forma a apresentarem uma concentração de 5 % (p/v) de acrilamida, e os géis de resolução foram preparados com concentração uniforme de 12,5 % (p/v) ou, em alternativa, com gradiente de concentração de acrilamida que variou entre 7,5 % e 15 % (p/v).

As células C6/36 foram infetadas com OCNV₁₇₄, tal como descrito na secção 2.3.1., tendo os sedimentos celulares sido recolhidos a 24, 48 e 72 horas após a infeção. Como controlo foram analisados extratos de células não infetadas, colhidos após 24, 48 e 72 horas de cultura, nas mesmas condições e um tempo considerado 0 horas, cujo tratamento foi igual ao tempo zero da cinética, substituindo a suspensão viral por meio de cultura com 2 % de FBS sem vírus.

Os sedimentos celulares foram recolhidos por centrifugação a 14.500 g (1 minuto), lavados em duplicado com uma solução de PBS e ressuspensos diretamente

em 50 μ L de tampão de SDS-PAGE 3x concentrado [4 % (p/v) SDS, 0,1 M Tris-HCl pH=6,8, 5 % (v/v) 2-mercaptoetanol, 10 % (v/v) glicerol e 0,05 % (p/v) azul de bromofenol]. Posteriormente, a mistura foi fervida a 100°C durante 5 minutos para promover a desnaturação total das proteínas solubilizadas.

A eletroforese foi efetuada utilizando o sistema vertical *SE 400* (Hoefer Inc, E.U.A.) e a migração das proteínas contidas em 10 μ L de cada um dos extratos celulares decorreu a uma corrente constante de 80 V em tampão de eletroforese 1X (0,192 M glicina, 0,025 M Tris-HCl pH=8,3, 0,1 % SDS). Os marcadores de massas moleculares utilizados foram a mistura *ColorBrustTM* (Sigma-Aldrich, E.U.A) e o *Low Molecular Weight (LMW) Protein Marker* (NZYTech, Portugal).

A deteção de proteínas foi efetuada com recurso a uma solução de coloração contendo Azul de Coomassie (*Bio-Safe Coomassie*, BioRad, E.U.A.) de acordo com as instruções do fabricante. Sucintamente, no final das eletroforeses os géis foram lavados 3 vezes com água desionizada sob agitação ligeira e imersos na solução de coloração acima referida, durante 1 hora com agitação, de acordo com as indicações do fabricante. Após a coloração foi efetuada uma nova lavagem (20 minutos) com água desionizada para retirar o excesso de corante. As fotografias foram obtidas através do *Gel Doc XR System* (BioRad, E.U.A.).

2.8. Extração de RNA viral

A extração de RNA viral foi feita recorrendo ao sistema comercial *ZR Viral RNA KitTM* (Zymo Research, E.U.A.) e o protocolo foi executado segundo as instruções do fabricante. O RNA viral foi isolado a partir de dois tipos de amostras biológicas, macerados de mosquitos e sobrenadantes de culturas celulares, e o volume de partida variou entre 100 e 150 μ L. Brevemente, a técnica consistiu na adição de 3 volumes de um tampão de lise (*ZR Viral RNA Buffer*), a cada volume de amostra, provocando a desintegração das partículas virais. O lisado foi forçado a atravessar, por centrifugação, uma matriz inserida numa microcoluna (*Zymo-SpinTM IC Column*), à qual o RNA ficou adsorvido. Posteriormente, a coluna foi lavada para remover eventuais contaminantes a esta adsorvidos de forma não específica, e o RNA eluído, por centrifugação, em 30 μ L de água livre de RNases. As amostras foram armazenadas a -80°C até futura utilização.

2. Material e Métodos

2.9. Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi efetuada com recurso ao sistema comercial *Phusion RT-PCR Kit* (*Thermo Fisher Scientific*, E.U.A.) e o protocolo executado de acordo com as indicações do fabricante.

Para a reação de síntese de cDNA foi utilizado um volume de 5 µL de RNA viral (extraído como descrito na secção 2.8.), ao qual foram adicionados 2 µL de uma combinação de *primers*, incluindo oligo (dT) (100 ng/µL) e hexâmeros de sequência aleatória (50 ng/µL), e 1 µL de uma mistura de dNTPs (10 mM). A mistura contendo o RNA viral foi incubada a 65°C (5 minutos) e depois colocada no gelo (5 minutos). Posteriormente foram adicionados 2 µL de tampão de reação (10X) e igual volume de uma mistura contendo transcriptase reversa (*M-MuLV RT*) e um inibidor de RNases. O volume total de reação foi 20 µL.

A transcrição reversa das moléculas de RNA decorreu num termociclador *mycycler* (*Bio-Rad*, E.U.A.) e o perfil térmico utilizado consistiu num passo de hibridação/polimerização a 25°C durante 10 minutos, polimerização a 45°C durante 60 minutos e inativação da transcriptase reversa a 85°C durante 5 minutos. As amostras foram armazenadas a -20°C até nova utilização.

2.10. Desenho e características de oligonucleótidos (*primers*) utilizados na amplificação/sequenciação de sequências virais

O desenho dos *primers* utilizados nas reações de amplificação e sequenciação foi efetuado com base na construção de vários alinhamentos das sequências nucleotídicas de genomas completos de negevírus, recorrendo a um *software* informático de alinhamentos disponível *online* denominado *MAFFT* versão 7 (Kato e Toh, 2008). Para a construção dos alinhamentos foram utilizadas sequências virais disponíveis na base de dados do *GenBank* com os números de acesso JQ675605, JQ675608 e JQ675609 (*Negev Virus*), JQ675610, JQ675612 e JQ675611 (*Loreto Virus*), JQ686833 (*Ngewotan Virus*), JQ675607 (*Piura Virus*), JQ675604 (*Dezidougou Virus*) e JQ675606 (*Santana Virus*). Para além destas sequências foi também utilizada outra, com aproximadamente 9350 nucleótidos, correspondendo à sequência genómica quase

2. Material e Métodos

completa do OCNV₁₇₄ (HF913429), anteriormente obtida no laboratório de virologia do IHMT (R. Parreira, comunicação pessoal).

Os *primers* foram desenhados de acordo com as potenciais zonas de maior conservação entre os genomas alinhados, tendo em consideração características padronizadas que contribuem para a especificidade e sensibilidade das reações de amplificação em que estes venham a ser utilizados. O tamanho de cada *primer* variou entre 18 e 30 nucleótidos, para que o valor da temperatura de hibridação respeitasse o intervalo 52-58°C e o conteúdo percentual em G+C variasse entre 45 e 60 % (Abd-El salam, 2003). Os *primers* foram igualmente desenhados de modo a que não emparelhassem consigo próprios, nem formassem dímeros ou estruturas secundárias. A construção de *primers* degenerados foi efetuada com um limite de seis posições degeneradas por *primer*, para não aumentar em demasia a complexidade da mistura dos mesmos. As temperaturas de desnaturação de cada um dos *primers* foram calculadas recorrendo à ferramenta informática *Tm calculator – Thermo scientific* (disponível online em <http://www.thermoscientificbio.com/webtools/tmc/>), segundo a termodinâmica de Allawi e SantaLucia (1998). Os *primers* utilizados ao longo deste trabalho estão representados na tabela 1.

Tabela 1 – *Primers* utilizados para amplificação/sequenciação do genoma de negevírus

Designação do <i>Primer</i>	Sequência (5'- 3')	Posição ¹	Tm
NegF	CAYGTRAARATYTTCTGCGAYATGTC	6511-6536 ²	54°C
NegR	GAGTGACAGAMAACRGTYTGMCCG	7743-7769 ²	58,2°C
NegF2	AAGTTCAAYCTYGAGATYAARTTYTTCGAGTTTGA	6958-6992 ²	57,3°C
NeginF	AGTGCTTCAACGTGACATCCCCCGTCC	6555-6582 ²	64,1°C
NeginR	TAATCGTTTGTGCGGTARACATTGAGGC	7554-7581 ²	58,6°C
LorFout	CCTCCCGAATCGCTGGATCCTCTCTGG	6247-6273 ³	63,7°C
LorRout	CCACATGAAGGAGGAAGTGTACAACC	7267-7292 ³	57,7°C

2. Material e Métodos

LorF	CGGCAATTTGGAATCGAAGAGGAACTTGTC	6352-6382 ³	60,1°C
LorR	TGTGCGATGAACTTCGATACATTCCGGGTC	7219-7248 ³	61,6°C
DenzF	TAATTTGTGYGTTACYGCTCTKACTMGGCACAC	4846-4878 ⁴	61,4°C
DenzR	ATACGAACYTTRGGATTRCGTTTCAGAGAC	5923-5952 ⁴	57,4°C
DenzinR	GCKGGAGCAGGAGTGCTCAACMMCGG	5606-5631 ⁴	66,3°C
OpIE1-F	TATATGCTAGCTTGGTCATGCGAAACACGCACG	1661-1682 ⁵	58,9°C
OpIE1-R	TATATAAGCTTGTCAACACGTGCTGCAGCCCG	1971-1992 ⁵	61,8°C
orf1BamHI	ATATGGATCCATAATGGTCTTGCGAACACCCATGCCTCAC	6044-6066 ⁶	59,9°C
orf2BamHI	ATATGGATCCATAATGGCCGACGAACGCAATTCAGTCAACTG	7256-7281 ⁶	58,9°C
orf3BamHI	ATATGGATCCATAATGGCTGCTGCCCCCGAAAGCGATCTGCA	8628-8653 ⁶	66,9°C
orf1NotI	ATTATATAGCGGCCGCCGAAATCAGACTGAACACAACGTATG	7312-7338 ⁶	56,5°C
orf2NotI	ATTATATAGCGGCCGCCCTATGGAAGAATCTGAATAGATTTTACACA	8543-8572 ⁶	51,9°C
orf3NotI	ATTATATAGCGGCCGCCAGCGGTAGTTGTGTTCCGGCGGAGCGC	9221-9247 ⁶	68,5°C
F0	CCTTCACCCGGTTCAAGTATCTTG	31-54 ²	55,8°C
R0	CGGAGGCGATGTTGGTCCTCC	570-590 ²	60,1°C
F11	TACACTCGTGTACACCACGACGC	5197-5219 ²	60,8°C
R11	AATGCTGWGCGTTCTTAACTGCG	6926-6949 ²	57,6°C
F13	CCTCCCGACTGACAAACCCTATTGC	8237-8261 ²	59,8°C
R13	GACGCGGACGTTATCGGGTGTGTCG	8999-9023 ²	63,3°C
F12	CTTCCGAACATGACCGACGAACGC	7243-7266 ²	62,1°C
NegPolR	CRGTGAGGTTTRGGTTTCGGCTTGCG	6364-6388 ²	62,4°C
1NS5F	GCATCTAYAWCAYNATGGG	9035-9053 ⁷	46,9°C
1NS5R	CCANACNYNRTCCANAC	10129-10146 ⁷	48,2°C
2NS5F	GCNATNTGGTWYATGTGG	9103-9120 ⁷	47,2°C

2NSSR	CATRTCTTCNGTNGTCATCC	10103-10122 ⁷	49,4°C
-------	----------------------	--------------------------	--------

As sequências sublinhadas correspondem aos locais de reconhecimento das enzimas de restrição *Bam*HI (GGATCC), *Not*I (GCGGCCGC), *Nhe*I (GCTAGC) e *Hind*III (AAGCTT). As sequências a negrito correspondem à sequência de Kozak. ¹ Posição relativa a genomas de referência; ² vírus Negev, estirpe EO-329 [tal como descrito por Ferreira *et al.* (2013)]; ³ vírus Loreto, estirpe 3940-83; ⁴ vírus Dezigougou, estirpe ArA 20086; ⁵ sequência de referência: Vetor pIZT/V5-His (*Invitrogen*, E.U.A.); ⁶ OCNV₁₇₄ (HF913429); ⁷ vírus do Nilo Ocidental, estirpe NY99-flamingo382-99 [tal como descrito por Vázquez, *et al.* (2012)].

Nota: Posições degeneradas – R=G/A; Y=T/C; M=A/C; K=G/T; W=A/T; N=A/C/G/T

2.11. Amplificações de sequências genómicas viral

2.11.1. Amplificação de fragmentos de DNA por PCR convencional

As reações de amplificação de DNA por PCR convencional foram executadas recorrendo, essencialmente, a dois sistemas comerciais. Numa primeira etapa foi utilizado o sistema comercial *Phusion RT-PCR Kit* (*Thermo Fisher Scientific*, E.U.A.) que, para além de permitir a síntese de cDNA a partir de RNA previamente extraído permite, adicionalmente, efetuar reações de amplificação de sequências nucleotídicas através do uso da polimerase *PhusionTM High-Fidelity DNA Polymerase* (*Thermo Fisher Scientific*, E.U.A.). Esta enzima é caracterizada pela sua rapidez e eficácia e, por possuir uma elevada capacidade de correção de provas (do inglês *proofreading*), apresentando uma taxa de erro de $4,4 \times 10^{-7}$. Como tal, este sistema foi particularmente utilizado para amplificar fragmentos de genomas virais de negevírus potencialmente presentes nos macerados de mosquitos produzidos. Para o rastreio de negevírus foram aplicadas abordagens de *nested*-PCR ou *heminested*-PCR, de forma a aumentar a sensibilidade e especificidade das amplificações pretendidas. Para o rastreio de genomas de negevírus em extratos de RNA preparados a partir de macerados de mosquitos foram utilizados três conjuntos de *primers*: NegF/NegR e NegF2/NegR foram utilizados na deteção de vírus Negev, Piura e Ngewotan; LorFout/LorRout e LorF/LorR foram utilizados na deteção de vírus Loreto; DenzF/DenzR e DenzF/DenzinR foram utilizados na deteção de vírus Santana e Dezidougou. Estes três grupos de *primers*, para além de permitirem, eventualmente, detetar os vírus acima referidos, permitiriam também detetar eventuais vírus com sequências genómicas semelhantes aos mesmos, dentro de

2. Material e Métodos

cada grupo. Ocasionalmente foi utilizado outro par de *primers*, NeginF/NeginR, desenhado com o intuito de apenas permitir a amplificação de vírus de tipo Negev, diminuindo a possibilidade de amplificação de vírus de tipo Piura ou Ngewotan.

A polimerase de DNA do sistema comercial *Phusion RT-PCR Kit* foi igualmente utilizada para amplificar fragmentos de genoma viral passíveis de serem utilizados em processos de clonagem. Os pares de *primers* utilizados para amplificar os fragmentos a clonar foram: OpIE1-F/OpIE1-R para amplificar o promotor OpIE1 (promotor dos genes de expressão precoce-imediata do vírus da poliedrose de *Orgyia pseudotsugata* - OpMNPV) localizado no vetor pIZT/V5-His (*Invitrogen*, E.U.A.) e orf1BamHI/orf1NotI, orf2BamHI/orf2NotI e orf3BamHI/orf3NotI para amplificar sequências codificantes da polimerase viral e proteínas transmembranares (ORF1 e ORF2), respetivamente.

O protocolo de amplificação foi executado segundo as instruções do fabricante e, sucintamente, consistiu na utilização de um volume de 2,5 µL de matriz de cDNA, ao qual foram adicionados *primers* (diluídos a 10 pmol/mL), para uma concentração final de 0,5 µM, tampão de reação (5X) para uma concentração de 1X, mistura de dNTPs (10 mM) para uma concentração final de 200 µM cada e polimerase *Phusion*TM (2 U/µL) cuja concentração final foi de 0,02 U/µL. A reação ocorreu num volume total de 25 µL. Para as reações de *nested*-PCR, ou *heminested*-PCR, foram utilizados 2 µL do produto de PCR obtido na primeira amplificação tendo sido mantidas as concentrações da mistura de reação. Os protocolos de amplificação consistiram num passo inicial de desnaturação a 98°C (30 segundos), seguindo-se 40 ciclos constituídos por um passo de desnaturação a 98°C (10 segundos), um passo de hibridação dos *primers*, em que a temperatura variou entre os 52°C e 55°C (30 segundos) e um passo de extensão dos mesmos a 72°C (1 minuto), terminando com uma extensão final a 72°C (5 minutos). No final deste processo, as misturas de PCR foram mantidas a 4°C.

Alternativamente, foi utilizada a mistura comercial *Supreme NZYTaQ 2x Green Master Mix* (*NZYTech*, Portugal). O protocolo foi executado de acordo com as indicações do fabricante e as reações efetuadas a partir de um volume de matriz que variou entre 2 e 5 µL para volumes finais de 25 µL. Os *primers* (diluídos a 10 pmol/mL) foram adicionados à mistura de reação contendo o volume de matriz estabelecido, de modo a que a concentração final dos mesmos fosse de 400 nM. Quanto às condições de

amplificação dos vários fragmentos pretendidos, foi utilizado um protocolo de base que consistiu num passo inicial de desnaturação a 94°C (2 minutos), seguindo-se 40 ciclos de uma etapa de desnaturação a 94°C (30 segundos), uma etapa de hibridação, em que a temperatura variou entre os 50°C e 55°C (30 segundos; em função do par de *primers* utilizados), e uma etapa de extensão a 72°C, cujo tempo variou entre 45 segundos e 3 minutos (de acordo com o tamanho do fragmento a amplificar). Por último, foi efetuada uma extensão final a 72°C (5 minutos) seguida de um passo de manutenção das reações de amplificação a 4°C. As reações de amplificação foram executadas em dois termocicladores, de acordo com o volume final da reação: termociclador *mycycler* (Bio-Rad, E.U.A.) e termociclador *PCR Express* (Thermo Hybaid, Reino Unido).

Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em géis de agarose, cuja concentração variou entre 1% e 1,5%, em tampão TAE 0,5X, na presença de brometo de etídio (0,5 µg/mL). A migração dos produtos de amplificação decorreu com corrente entre os 80 e os 150 V, tendo o tempo da mesma variado entre 1 a 2 horas, em função do tamanho dos fragmentos amplificados. Para estimar o tamanho dos fragmentos amplificados foram utilizados dois marcadores constando de misturas de vários fragmentos de DNA de diferentes massas moleculares nomeadamente o *NZYDNA Ladder VI* (NZYtech, Portugal), essencialmente para quantificar e determinar o tamanho de fragmentos de DNA, entre 50 e 1500 pb (pares de bases), e o *Lambda – pUC Mix Marker 4* (Fermentas, Lituânia) para analisar géis nos quais tivessem sido separados fragmentos de DNA com dimensões entre 421 e 19329 pb.

2.11.2. Amplificação fragmentos de DNA por PCR em tempo real

A amplificação de fragmentos recorrendo à técnica de PCR em tempo real foi executada com a mistura comercial *Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix 2x* (Thermo Fisher Scientific, E.U.A.). Neste caso, a deteção do produto de amplificação está dependente da emissão de fluorescência resultante da ligação de *SYBR Green I* ao DNA amplificado. O protocolo foi executado segundo as instruções do fabricante e incluiu a utilização de 2 µL de matriz (cDNA), *primers* (diluídos 10 pmol/mL) para uma

2. Material e Métodos

concentração final de 300 nM, e 12,5 mL de mistura de reação. As reações de amplificação ocorreram num volume total de 25 µL.

Esta reação foi executada num termociclador *RotorGene 3000* (Corbett Research, Reino Unido) tendo sido utilizado um protocolo em três passos que consistiu numa desnaturação inicial a 95°C (10 minutos), seguida de 30 a 40 ciclos de desnaturação rápida a 95°C (15 segundos), hibridação a 60°C (30 segundos) e extensão a 72°C (30 segundos). Em cada um dos ciclos, a deteção de fluorescência foi efetuada durante o passo de extensão do protocolo usado.

2.12. Hidrólise de DNA com endonucleases de restrição

Os fragmentos de DNA amplificados por PCR e os plasmídeos utilizados como vetores de clonagem foram digeridos com as enzimas: *Bam*HI (*Fermentas*, Lituânia), *Hind*III (*Fermentas*, Lituânia), *Not*I (*Fermentas*, Lituânia) e *Nhe*I (*Fermentas*, Lituânia). Pontualmente foi utilizada a enzima *Bgl*II (*Fermentas*, Lituânia) (ver secção 2.13.1.).

As reações de digestão foram executadas segundo as instruções disponibilizadas pelo fornecedor comercial das enzimas utilizadas e consistiu em preparar uma mistura de reação, num volume que variou entre 20 e 30 µL, que contivesse o DNA a hidrolisar, tampão de reação (10X) para uma concentração final de 1X e a respetiva endonuclease de restrição (10 U/µL) numa concentração final entre 0,5 e 1 U/µL. Como nem todos os tampões de reação continham BSA [*bovine serum albumine*; albumina sérica bovina (10X)] na sua composição, esta foi ocasionalmente adicionada às misturas de reação, numa concentração final de 1X, para garantir a estabilização enzimática quando as digestões eram efetuadas durante a noite. A mistura de reação foi incubada numa estufa a 37°C durante a noite, ou à mesma temperatura em banho-maria, durante 2 horas.

Devido à incompatibilidade entre os tampões de reação e as respetivas atividades enzimáticas, foi efetuado um passo de diálise, após o período de incubação. As enzimas foram inativadas durante 20 minutos, *Nhe*I a 65°C e *Hind*III, *Bam*HI e *Not*I a 80°C, e a mistura dialisada com água destilada durante 1 hora, através do uso de filtros de diálise de 0,025µm VSWP (*Millipore*, E.U.A.).

2.13. Clonagem de produtos de PCR

2.13.1. Clonagem no vetor plasmídico pJet1.2/*blunt*

O vetor plasmídico pJet1.2/*blunt*, constituinte do sistema comercial *CloneJET™ Cloning Kit* (Fermentas, Lituânia) (ver Anexo 1), foi utilizado para a estabilização de fragmentos de genoma viral cujo rendimento de amplificação demonstrou ser baixo de um modo reprodutível, evitando assim a sua repetida amplificação a partir de cDNA. O pJet1.2/*blunt* consiste num vetor plasmídico de clonagem, apresentado comercialmente sob a forma de uma molécula linear e caracterizado por possuir extremidades cegas e fosforiladas em 5', permitindo a clonagem de moléculas de DNA com extremidades cegas. A seleção de clones recombinantes baseia-se no facto deste vetor possuir um gene que codifica uma enzima de restrição (*eco47IR*), a qual é expressa quando ocorre a recircularização do vetor, impedindo a propagação de clones bacterianos em que estes plasmídeos estejam presentes, como consequência da clivagem do DNA bacteriano.

Adicionalmente, o vetor transporta um gene (*bla*) que codifica para uma beta-lactamase. Como tal, apenas os clones recombinantes que transportem plasmídeos derivados de pJet1.2/*blunt* com insertos, e que sejam, por conseguinte, resistentes a antibióticos beta-lactâmicos como a ampicilina, são passíveis de serem revelados em meio de cultura contendo este antibiótico.

O protocolo de clonagem foi executado segundo as instruções do fabricante e consistiu na preparação de uma mistura de ligação com um volume final de 10 µL contendo 50 ng do plasmídeo pJet1.2/*blunt* linearizado, tampão de reação (2X) concentrado 1X, ligase de DNA do fago T4 (5 U/µL) numa concentração final de 0,25 U/µL e 4 µL de cada um dos produtos de PCR correspondentes aos fragmentos a clonar numa concentração final de 0,15 pmol/µL. A mistura de ligação foi mantida num banho-maria a 16°C durante a noite e, no final deste período, a ligase de DNA foi inativada a 65°C durante 15 minutos.

A seleção de clones potencialmente recombinantes foi efetuada, após transformação de uma estirpe hospedeira, e tal como descrito na secção 2.14., em placas de meio de cultura LB (*Luria-Bertani*) sólido (1 % triptona, 0,5 % extrato de levedura, 1 % NaCl, 1,5 % agar em água destilada, pH=7) suplementado com ampicilina (100 µg/mL). A verificação da presença de inserto no vetor foi efetuada mediante a análise da presença de moléculas de DNA plasmídico com migração retardada relativamente a

2. Material e Métodos

moléculas sem inserto. A validação dos resultados foi efetuada pela análise de perfis de restrição após a digestão dos clones potencialmente recombinantes com a enzima *Bgl*III (*Fermentas*, Lituânia), de acordo com o protocolo descrito na secção 2.12.

Alternativamente, a confirmação da presença de inserto foi efetuada mediante amplificação por PCR convencional com o par de *primers* comercial pJet1.2 F (5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3') e pJet1.2 R (5'-AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG-3') (*Thermo Fisher Scientific*, E.U.A.), seguida de migração dos produtos de amplificação em eletroforese em gel de agarose, a 100 V durante 1 hora.

2.13.2. Clonagem de DNA usando o vetor plasmídico pIC111

O plasmídeo pIC111 (Cheeseman e Desai, 2005), derivado do plasmídeo pcDNA 3.1 (*Invitrogen*, E.U.A.) (ver Anexo 2), foi utilizado para efetuar clonagens de fragmentos de DNA codificantes de proteínas por negevírus, ou de domínios destas.

Para a clonagem de fragmentos de DNA optou-se pela utilização de uma proporção molar de 3:1 (inserto:vetor), tendo o procedimento consistido, essencialmente, em três etapas: hidrólise de DNA com endonucleases de restrição, seguida de uma coprecipitação de DNA e terminando com a produção de mistura de ligação, para uso posterior na transformação de bactérias competentes.

Após a hidrólise do DNA inserto/vetor com endonucleases de restrição (ver secção 2.12.), foi efetuada uma coprecipitação da mistura inserto/vetor de clonagem, de forma a permitir que o volume final das misturas de ligação a efetuar, fosse o menor possível. A técnica de coprecipitação consistiu em adicionar acetato de sódio (3M) e glicogénio concentrado (20 mg/mL) nas razões de 1:10 e 1:100, respetivamente, ao volume de suspensão contendo o DNA, seguida da adição de 3 volumes de etanol (96 %). Após uma incubação a -70°C (1,5 horas) o DNA foi recuperado por centrifugação a 14.500 g (30 minutos), lavado com etanol (70 %) e o sedimento seco numa estufa a 37°C (15 minutos). A mistura de ligação foi obtida após hidratação do sedimento de DNA em 8 µL de água pura e adição de tampão de reação concentrado (2X) para uma concentração final de 1X e ligase (5 U/µL) numa concentração final de 0,25 U/µL. A

reação foi efetuada num volume final de 10 μ L tendo a mistura de ligação sido incubada numa banho-maria a 16°C durante a noite, seguindo-se a inativação da ligase a 65°C durante 15 minutos.

A seleção de eventuais clones recombinantes foi efetuada, após transformação como descrito na secção 2.14., recorrendo a placas de meio de cultura LB sólido suplementado com ampicilina (100 μ g/mL).

2.14. Preparação de células competentes de *Escherichia coli* e a sua transformação por choque térmico

O protocolo de preparação de células competentes utilizado foi adaptado de Chung *et al.* (1989) tendo sido utilizadas células de *E. coli NovaBlue* (Merck KGaA, Alemanha). Resumidamente, a preparação de células competentes foi iniciada com a obtenção de uma cultura saturada de *E. coli Nova Blue* em 5 mL de meio de cultura LB líquido suplementado com 12,5 μ g/mL de tetraciclina, a qual foi mantida durante a noite a 37°C com agitação constante (220 rpm). Posteriormente, foi utilizado um volume de 150 μ L da cultura saturada assim obtida para inocular 15 mL de meio de cultura LB líquido (razão 1:10) suplementado com ampicilina (100 μ g/mL). A cultura ficou incubada a 37°C, com agitação, até atingir uma densidade ótica no intervalo (0,3-0,5), a um comprimento de onda de 600 nm. As células foram recolhidas por centrifugação a 3.300 g (30 minutos a 4°C) e ressuspensas em 500 μ L de TSS refrigerado [*Transformation and Storage Solution*; 10 % PEG (*Polyethylene Glycol*; polietilenoglicol), 5 % DMSO (*Dimethyl Sulfoxide*; dimetilsulfóxido), 20 mM MgCl₂ em meio de cultura LB líquido].

Para a etapa de transformação foram utilizados 200 μ L de células ressuspensas em TSS aos quais se adicionaram 5 μ L de cada mistura de ligação, preparadas como descrito na secção 2.13.2., e a mistura foi mantida no gelo (45 minutos) com agitações periódicas. Posteriormente, foi efetuado o choque térmico a 42°C durante 45 segundos, tendo a suspensão bacteriana sido imediatamente recolocada no gelo durante 5 minutos. Findo esse tempo, a suspensão bacteriana foi adicionada de 800 μ L de meio de cultura SOC (*Super Optimal broth with Catabolite repression*; Hanahan, 1983) e incubada a

2. Material e Métodos

37°C (1 hora) com agitação (80 rpm). A suspensão bacteriana foi, em seguida, semeada (alíquotas de 200 µL) em placas com meio de cultura LB sólido suplementado com ampicilina (100 µg/mL), seguida da incubação das mesmas numa estufa a 37°C durante a noite.

2.15. Extração, em pequena escala, de DNA plasmídico por lise alcalina

O rastreio de clones bacterianos possivelmente recombinantes foi efetuado com recurso a uma análise do DNA plasmídico de clones bacterianos individuais, obtido através de uma extração do mesmo por lise alcalina, segundo o protocolo descrito por Sambrook *et al.* (1989). Colónias bacterianas presentes em placas com meio de cultura LB sólido, correspondentes a clones possivelmente recombinantes, foram repicadas com o auxílio de um palito estéril, inoculadas em meio de cultura LB líquido suplementado com ampicilina (100 µg/mL) e incubadas a 37°C com agitação (220 rpm) durante a noite. A partir de cada cultura isolada foi efetuada a extração de DNA plasmídico e a técnica utilizada foi iniciada com a recolheita das células contidas em 2 mL de cultura por centrifugação a 14.500 g (2 minutos), seguida da ressuspensão do sedimento celular em 250 µL de solução TEG (25 mM Tris-HCl pH=8,0, 1 mM EDTA, 1 % Glucose).

Posteriormente, foi adicionado igual volume de solução de lise (0,2 M NaOH, 1,5 % SDS), para promover a lise bacteriana, seguida de igual volume de solução de acetato de potássio (3 M) para neutralizar o pH dos lisados. A mistura foi centrifugada a 14.500 g (15 minutos), o sobrenadante recolhido e os ácidos nucleicos precipitados por centrifugação a 14.500 g (25 minutos) após a adição de 700 µL de isopropanol absoluto.

O sedimento contendo ácidos nucleicos foi lavado com etanol (70 %), seco na estufa a 37°C (15 minutos) e ressuspendido em 30 µL de tampão TE suplementado com 100 µg/mL de RNase. O DNA foi incubado em banho-maria a 37°C (30 minutos) para degradar o RNA presente.

Após a extração do DNA plasmídico, os clones recombinantes foram selecionados mediante a análise do seu perfil eletroforético em géis de agarose (como descrito na secção 2.11.1.), a 100 V durante 1 hora, por comparação ao perfil de plasmídeos de igual tamanho desprovidos de inserto. A confirmação da presença de

clones recombinantes foi igualmente efetuada pela análise do perfil de eletroforese após digestão com enzimas de restrição *Bam*HI (*Fermentas*, Lituânia) e *Not*I (*Fermentas*, Lituânia), de acordo com o protocolo descrito na secção 2.12.

2.16. Purificação de DNA

2.16.1. Purificação de moléculas de DNA amplificadas por PCR

Para efetuar a purificação de moléculas de DNA amplificadas por PCR foram utilizados dois sistemas comerciais, ambos executados de acordo com as sugestões do fabricante.

O sistema *ZymocleanTM Gel DNA Recovery Kit* (*Zymo Research*, E.U.A.) permitiu efetuar uma purificação de DNA a partir de bandas contidas em géis de agarose. Para tal, foi excisada uma secção do gel de agarose contendo as moléculas de DNA pretendidas, seguida da adição de 3 volumes do tampão dissolvente de agarose (*ADB*) e incubada a 55°C (10 minutos) até a agarose se dissolver na totalidade. A mistura dissolvida assim obtida, foi transferida para uma coluna (*Zymo-SpinTM Column*) à qual, e após centrifugação, ficaram adsorvidas as moléculas de DNA. Posteriormente, a coluna foi lavada com uma solução de lavagem (*Wash Buffer*) e o DNA eluído, por centrifugação, em 10 µL de água estéril.

Em alternativa, foi utilizado o sistema *DNA Clean & ConcentratorTM -5* (*Zymo Research*, E.U.A.) que permitiu purificar, e concentrar, DNA diretamente a partir da solução contendo ácidos nucleicos. Sucintamente, foi adicionada uma solução tamponada (*DNA Binding Buffer*), numa razão de 5:1 (tampão:DNA) à solução contendo as moléculas DNA, de forma a que estas se ligassem a uma coluna (*Zymo-SpinTM Column*). Após transferência da mistura contendo o DNA para a coluna, esta foi lavada e o DNA recolhido por centrifugação em 10 µL de tampão de eluição (*DNA Elution Buffer*).

A avaliação do rendimento das purificações executadas, recorrendo a ambos os sistemas, foi efetuada por eletroforese em gel de agarose a 1 % (p/v), a 80 V durante 30 minutos.

2. Material e Métodos

2.16.2. Purificação de moléculas de DNA plasmídico

As moléculas de DNA plasmídico foram purificadas recorrendo, sobretudo, a dois tipos de técnicas. O DNA plasmídico que viria a ser sequenciado foi purificado por reprecipitação do mesmo na presença de cloreto de lítio. Esta purificação, foi iniciada pela adição de um volume de cloreto de lítio (10 M) à solução contendo o DNA plasmídico, seguida de incubação da mistura a -20°C (20 minutos). Finda a incubação, e após centrifugação da mistura a 14.500 g (10 minutos), a fase líquida foi recolhida e os ácidos nucleicos precipitados pela adição de 1 volume de isopropanol. O sedimento foi recolhido por centrifugação a 14.500 g (30 minutos), lavado com etanol (70 %), seco numa estufa a 37°C (15 minutos) e ressuscitado em 15 µL de água pura. A avaliação do rendimento da purificação foi efetuada por eletroforese das moléculas purificadas em gel de agarose a 1 %, a 80 V durante 30 minutos.

Por outro lado, o DNA plasmídico utilizado na transfeção de células eucariontes foi purificado por adição de acetato de sódio (3 M) na razão 1:10, 3 volumes de etanol (96 %) à solução contendo o DNA em questão, seguida de incubação da mistura a -70°C (1 hora). Em seguida, o sedimento de ácidos nucleicos foi recuperado por centrifugação a 14.500 g (30 minutos), lavado com etanol (70 %), seco e ressuscitado em 15 µL de água estéril. A avaliação do rendimento da reação foi efetuada pela quantificação de DNA plasmídico após purificação no espectrofotómetro *Nanodrop 1000* (Thermo Fisher Scientific, E.U.A.).

Alternativamente, foi utilizado um sistema comercial *Plasmid Midi Kit* (QIAGEN, E.U.A.) para purificar DNA plasmídico em baixo número de cópias. O protocolo foi executado segundo as instruções do fabricante e consistiu na utilização de 100 mL de uma cultura de *E. coli Nova Blue* contendo o plasmídeo de interesse, obtida em meio de cultura LB líquido suplementado com ampicilina (100 µg/mL), durante a noite a 37°C com agitação (220 rpm). O sedimento celular foi recolhido por centrifugação a 6.000 g (15 minutos a 4°C) e ressuscitado no respetivo tampão (*Buffer P1*). Posteriormente foram adicionados, sequencialmente, tampão de lise (*Buffer P2*) e tampão de neutralização (*Buffer P3*), seguida de uma incubação no gelo (15 minutos). A solução contendo o DNA plasmídico foi centrifugada a 20.000 g (30 minutos a 4°C) e o sobrenadante recolhido, filtrado através da sua passagem por gaze estéril para remoção de fragmentos celulares contaminantes (não sedimentados durante o passo de

centrifugação anterior) e depositado no topo de uma coluna (*QIAGEN-tip*) previamente hidratada (*Buffer QBT*). Devido à força da gravidade, a solução contendo os ácidos nucleicos atravessou a resina presente na coluna, na qual ficou adsorvido o DNA plasmídico e, após duas lavagens da coluna (*Buffer QC*), o mesmo foi eluído em 5 mL de tampão de eluição (*Buffer QF*). Posteriormente, o DNA plasmídico foi precipitado pela adição de isopropanol e centrifugação a 15.000 g (30 minutos a 4°C). Após a lavagem do sedimento de DNA com etanol (70 %) e secagem ao ar, o mesmo foi ressuspendido em 50 µL de tampão TE suplementado com RNase (100 µg/mL). O rendimento da reação foi avaliado pela quantificação de DNA plasmídico purificado no espectrofotómetro *Nanodrop 1000* (*Thermo Fisher Scientific*, E.U.A.).

2.17. Sequenciação de DNA e análise de sequências nucleotídicas e aminoacídicas

As reações de sequenciação de DNA foram efetuadas por uma empresa de biotecnologia denominada STABVIDA (sediada em Portugal), que executa protocolos de sequenciação automática segundo o método de Sanger *et al.* (1977). As reações de sequenciação dos fragmentos amplificados foram efetuadas, na maioria das vezes, em ambos os sentidos, através da utilização de pares de *primers* previamente utilizados em reações de PCR. As sequenciações de DNA plasmídico recombinante foram igualmente efetuadas em ambas as cadeias, tendo sido utilizados pares de *primers* que permitissem sequenciar os fragmentos inseridos, bem como as zonas de junção entre os insertos e o vetor utilizado.

Os cromatogramas obtidos em resultado das reações de sequenciação foram analisados e editados recorrendo ao programa informático *BioEdit Sequence Alignment Editor*, versão 7.0.5.3. (Hall, 1999). Este permitiu também efetuar a construção de *contigs*, através do uso da ferramenta *CAP* (*Contig Assembly Program*), a partir de sequências nucleotídicas parcialmente sobreponíveis. O programa *Gene Runner* versão 3.05 (disponível para *download* em <http://www.generunner.net>) permitiu efetuar a análise de sequências nucleotídicas por comparação com as aminoacídicas, bem como estimar a localização de grelhas de leitura nos *contigs* efetuados. A identificação de semelhanças entre as sequências nucleotídicas e proteicas, obtidas no decorrer deste

2. Material e Métodos

trabalho, e as sequências depositadas em bases de dados foi efetuada com recurso ao servidor NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) utilizando os algoritmos *BLASTn* e *BLASTx* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

As relações filogenéticas entre sequências nucleotídicas homólogas foram inferidas a partir de alinhamentos de nucleótidos produzidos, utilizando a algoritmo *MAFFT* versão 7 (Kato e Toh, 2008) tendo os alinhamentos obtidos sido posteriormente editados manualmente utilizado o programa *Mega* versão 5.2 (Tamura *et al.*, 2011), mantendo cuidadosamente o alinhamento entre codões. As árvores filogenéticas foram construídas recorrendo, igualmente, ao programa *Mega* versão 5.2 (Tamura *et al.*, 2011). Visto que os modelos evolutivos nos quais se inferem as relações filogenéticas são definidos com base em aproximações matemáticas a uma realidade desconhecida, foram utilizadas duas abordagens distintas para a construção das árvores de forma a minimizar o enviesamento dos resultados pelo método selecionado. As árvores foram construídas com base nos critérios de junção de vizinhos (NJ do inglês *Neighbor-Joining*) e de máxima verosimilhança (ML do inglês *Maximum-Likelihood*), utilizando como modelo de substituição Kimura 2-Parâmetros e GTR+I+ Γ , respetivamente, este último selecionado segundo os critérios de informação de Akaike, tal como definido pela aplicação jModelTest (Darriba *et al.*, 2012). O teste de consistência topológica (*bootstrapping*) foi efetuado com réplicas que variaram entre 100 e 1000, dependendo do modelo matemático utilizado. Valores de *bootstrap* iguais ou superiores a 75 % foram definidos como critérios de aceitação e de robustez topológica das árvores obtidas.

3|

RESULTADOS

3. Resultados

3.1. Distribuição qualitativa de negevírus em diferentes espécies de mosquitos colhidos no sul de Portugal

O rastreio de genomas de negevírus potencialmente presentes nos macerados de mosquitos analisados foi efetuado através da amplificação de sequências conservadas dos genomas virais. A região alvo selecionada correspondeu a parte da sequência codificante da ORF1, e, mais especificamente, a parte do domínio que nesta parece ser responsável pela atividade de polimerase viral (polimerase de RNA dependente de RNA, ou RdRp). Na totalidade foram analisados 56 lotes de captura, correspondentes a igual número de macerados de mosquitos, que após extração de RNA total e síntese de cDNA (secções 2.8. e 2.9.), foram rastreados recorrendo a técnicas de *nested*-PCR e *hemined*-PCR (como descrito na secção 2.11.1.), utilizando pares de *primers* desenhados especificamente para esse efeito (Tabela 1). Os resultados decorrentes das amplificações efetuadas foram avaliados mediante a separação dos produtos obtidos por eletroforese em géis de agarose.

Para facilitar a manipulação e análise dos lotes de macerados, estes foram agrupados em três conjuntos, essencialmente em função das espécies de mosquito em causa, e cada conjunto foi rastreado de forma individual e sequencial. O primeiro conjunto de lotes processados foi constituído por macerados de mosquitos da espécie *Oc. caspius* identificados com os códigos 135, 142, 183, 186, 284, 293, 299, 390, 494, 539, 642, 670, 741, 781, 811, 833 e 837, e o segundo constituído por macerados de mosquitos maioritariamente das espécies *Cx. theileri*, identificados com os códigos 133, 148, 149, 151, 162, 178, 185, 200, 332, 347, 360, 392, 412, 415 e 416, e *An. atroparvus*, identificados com os códigos 131, 179, 182, 381, 429 e 436. Os restantes macerados de mosquitos foram processados num terceiro conjunto, o qual foi constituído por mosquitos maioritariamente da espécie *Cx. pipiens*, identificados com os códigos 156, 195, 202, 204, 291, 292, 335, 344 e 387. Neste último conjunto de lotes de captura foram ainda incluídos os espécimes das espécies *Cx. univittatus* com os códigos 326, 423 e 730, *Cx. laticinctus* com os códigos 732 e 739, *An. algeriensis* com o código 366, *Cu. Annulata* com o código 163, *Cu. longiareolata* com o código 176 e *Ae. detritus* com o código 649.

Análises filogenéticas previamente efetuadas com base na análise de sequências da RdRp viral permitiram verificar que as diferentes estirpes dos vírus Negev, Piura e Ngewotan formam um grupo monofilético, partilhando um ancestral comum (Vasilakis *et al.*, 2013). Assim, a deteção da presença de vírus de tipo Negev, Piura, Ngewotan, e eventuais vírus com sequências genómicas semelhantes aos mesmos (Negev, Piura ou Ngewotan-like) foi feita, essencialmente, mediante a utilização dos pares de *primers* NegF/NegR e NegF2/NegR (Tabela 1).

O resultado das amplificações de sequências virais por RT-PCR, utilizando o par de *primers* NegF/NegR (externos), revelou a presença de algumas bandas resultantes de amplificações não específicas em várias das reações envolvendo os extratos de RNA preparados a partir dos macerados analisados, à exceção de dois, identificados por 204 e 730. Nestes dois extratos, preparados a partir de macerados de mosquitos das espécies *Cx. pipiens* e *Cx. univittatus*, respetivamente, foi possível identificar a presença de duas bandas bastante intensas, com aproximadamente 1260 pb, sugerindo a presença de genomas de negevírus (Figura 9).

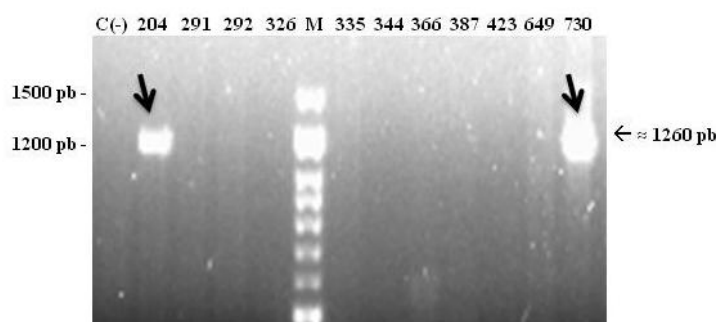


Figura 9 – Rastreio da presença de vírus Negev, Piura, Ngewotan, e/ou vírus geneticamente semelhantes, em extratos de RNA preparados a partir de macerados de mosquitos das espécies *Cx. pipiens* (204) e *Cx. univittatus* (730). Os produtos de amplificação de parte da sequência codificante da ORF1, correspondente a uma região do domínio da RdRp foram separados por eletroforese em gel de agarose 1 % (p/v). M – Marcador de massas moleculares: *NZYDNA Ladder VI* (NZYtech, Portugal).

De forma a aumentar a especificidade deste rastreio, foi efetuada uma reação de amplificação usando uma abordagem de *heminested*-PCR a partir dos produtos de amplificação obtidos na primeira reação, utilizando, para tal, o par de *primers* NegF2/NegR (internos). Os resultados da amplificação com os referidos *primers* revelaram, a presença de várias bandas de amplificação não específica decorrentes do

3. Resultados

uso de praticamente todos os extratos de cDNA analisados. No entanto, foi possível identificar a presença de algumas bandas com maior intensidade, usando extratos de RNA preparados a partir de macerados de mosquitos da espécie *Oc. caspius*. Apesar de apenas uma das bandas, associada ao extrato do lote 390, ter revelado a dimensão esperada para o fragmento amplificado (aproximadamente 800 pb), as bandas associadas aos extratos dos lotes 183, 494 e 539 foram igualmente consideradas como indicativas de potenciais produtos de amplificação de sequências virais (Figura 10A). Além disso, foi também possível identificar a presença de três produtos de amplificação com aproximadamente 800 pb cada, referentes aos extratos preparados a partir dos lotes de macerados de mosquitos das espécies *Cx. pipiens*, identificados por 204 e 292, e *Cx. univittatus*, identificado por 730 (Figura 10B). Curiosamente, os extratos de RNA referentes aos lotes 204 e 730 tinham anteriormente revelado a presença de fragmentos de amplificação com o tamanho esperado, ao utilizar o par de *primers* NegF/NegR (Figura 9).

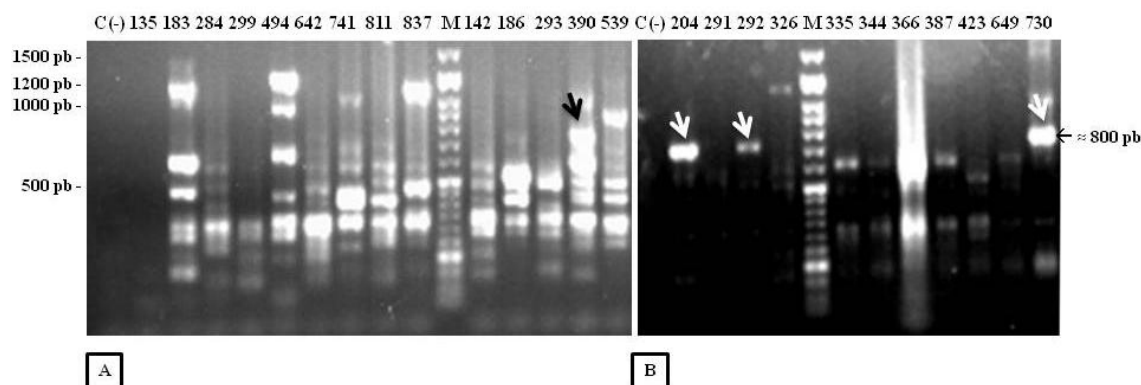


Figura 10 – Rastreo da presença de vírus de tipo Negev, Piura, Ngewotan, e/ou vírus geneticamente semelhantes a estes, em extratos de RNA preparados a partir de macerados de mosquitos das espécies (A) *Oc. caspius*, (B) *Cx. pipiens* (204 e 292) e *Cx. univittatus* (730). Os produtos de amplificação de parte da sequência codificante da ORF1, correspondente a uma região do domínio da RdRp foram separados por eletroforese em gel de agarose 1 % (p/v). M – Marcador de massas moleculares: NZYDNA Ladder VI (NZYtech, Portugal).

O rastreio de vírus de tipo Loreto, e/ou eventuais vírus com sequências genómicas semelhantes a estes, foi efetuado utilizando uma abordagem semelhante à anteriormente descrita, mas desta feita utilizando os pares de *primers* LorFout/LorRout (externos) e LorF/LorR (internos). Neste caso, as sequências de vírus Loreto disponíveis

nas bases de dados, revelaram-se bastante idênticas, pelo que o conjunto de *primers* desenhado demonstrou uma alta conservação (Tabela 1). Precisamente devido à sua baixa degeneração, os *primers* utilizados deveriam permitir amplificar, de forma mais específica, genomas destes vírus caso estivessem presentes nos extratos de RNA preparados. Em alternativa, não se esperaria a obtenção de produtos de amplificação caso i) genomas destes vírus não estivessem presentes nos extratos de RNA, e/ou ii) fossem geneticamente diferentes dos vírus Loreto descritos até então, limitando a capacidade de hibridação dos *primers* utilizados.

De acordo com a análise dos resultados das reações de amplificação efetuadas a partir dos extratos RNA obtidos de mosquitos de todas as espécies analisadas, foi possível identificar um total de dois extratos, ambos preparados a partir de macerados de mosquitos da espécie *Oc. caspius*, para os quais a presença de produtos de amplificação seria compatível com a presença de sequências de vírus Loreto. O rastreio efetuado com o par de *primers* LorFout/LorRout permitiu observar a presença de um produto de amplificação com aproximadamente o tamanho esperado (1050 pb), e referente ao extrato 390 (Figura 11). Quanto aos resultados de *nested*-PCR, na qual foi utilizado o par de *primers* LorF/LorR os quais deveriam permitir amplificar um fragmento com aproximadamente 900 pb, foi possível identificar um produto de amplificação, com aproximadamente o tamanho esperado, correspondente ao extrato 837 (Figura 11). Curiosamente, o extrato correspondente ao lote 390 foi anteriormente indicativo de conter sequências de negevírus, particularmente de vírus Negev.

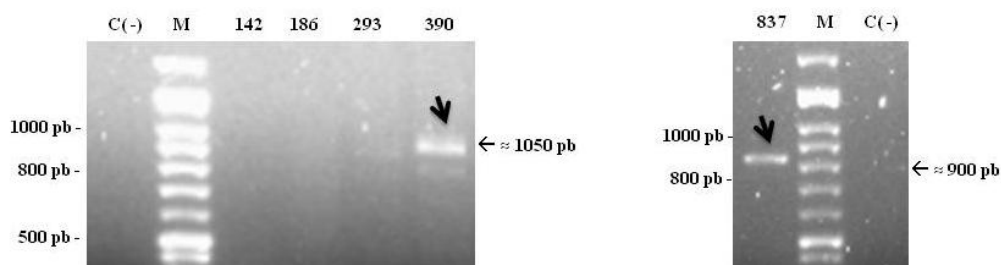


Figura 11 – Rastreio da presença de vírus Loreto e/ou vírus geneticamente semelhantes a estes, em extratos de RNA preparados a partir de macerados de mosquitos da espécie *Oc. caspius*. Os produtos de amplificação de parte da sequência codificante da ORF1, correspondente a uma região do domínio da RdRp foram separados por eletroforese em gel de agarose 1 % (p/v). M – Marcador de massas moleculares: *NZYDNA Ladder VI* (NZYtech, Portugal)

3. Resultados

A tentativa de deteção de vírus Santana/ Dezidougou, e/ou eventuais vírus com sequências genómicas semelhantes a estes, foi igualmente efetuada por amplificação por RT-PCR utilizando um protocolo de *nested*-PCR e dois pares de *primers*: DenzF/DenzR (externos) e DenzF/DenzinR (internos).

De acordo com os resultados das reações de amplificação verificou-se que, a grande maioria dos produtos de amplificação obtidos revelaram-se pouco abundantes e não-específicos. No entanto, foi possível identificar um extrato de RNA que revelou a presença de um produto de amplificação, presente em muito baixa quantidade, com aproximadamente 785 pb, correspondente à dimensão esperada para fragmentos amplificados com o par de *primers* DenzF/DenzinR (Figura 12). Embora o referido extrato de cDNA, preparado a partir de RNA extraído de um macerado de mosquitos da espécie *Cx. theileri* identificado por 392, tenha revelado a presença de um produto de amplificação com a dimensão esperada, a julgar pela sua baixa abundância poderia ser interpretado, não necessariamente, como sugestivo da presença de vírus do tipo rastreado, mas sim indicativo de uma amplificação não específica. Atendendo à especificidade relativa dos *primers* degenerados utilizados, a presença numa amostra biológica, de genomas virais com semelhanças relativas aos que vírus rastreados pode, casuisticamente, gerar produtos de amplificação quando estes genomas são usados como matriz. Ainda assim, este lote foi selecionado para posterior isolamento em cultura celular pela eventual possibilidade de conter genomas virais.

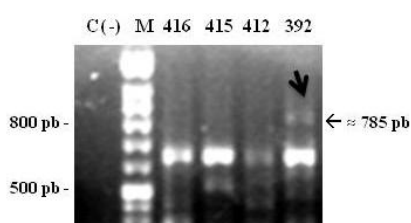


Figura 12 – Rastreo da presença de vírus Santana e Dezidougou, e/ou vírus geneticamente semelhantes a estes, em extratos de RNA preparados a partir de macerados de mosquitos da espécie *Cx. theileri*. Os produtos de amplificação de parte da sequência codificante da ORF1, correspondente a uma região do domínio da RdRp foram separados por eletroforese em gel de agarose 1 % (p/v). M – Marcador de massas moleculares: NZYDNA Ladder VI (NZYtech, Portugal)

No final do rastreio efetuado, foi possível reunir um conjunto de nove lotes de macerados potencialmente sugestivos de conterem genomas de negevírus, constituídos por mosquitos de diferentes espécies e capturados em pontos de colheita distribuídos por todas as regiões do Algarve em estudo: centro, aproximadamente de Loulé a Olhão; oeste, aproximadamente entre os concelhos de Lagos e Albufeira; e este aproximadamente de Tavira a Vila-Real de Santo António (Figura 13). Todos os lotes para os quais os resultados de amplificação obtidos foram negativos, ou revelaram a presença de produtos de amplificação com dimensões que traduziam, com grande probabilidade, amplificações não específicas, não foram mais considerados ao longo deste trabalho.

Os lotes identificados a verde na figura 13 representam os macerados de mosquito de onde foi possível isolar, efetivamente negevírus (ver secções seguintes).



Figura 13 – Distribuição de sequências de presumíveis negevírus em diferentes espécies de mosquitos capturados no Algarve. Mapa do Algarve e pontos de colheita distribuídos por três regiões principais: oeste, centro e este. Identificação dos lotes de macerados e espécies de mosquitos potencialmente sugestivos de conterem genomas de negevírus e respetivos pontos de colheita. Em verde estão representados os lotes de macerados de onde foi possível isolar negevírus. *Adaptado de Costa, 2011.*

3.2. Isolamento viral e análise microscópica de células C6/36 infectadas

A observação de produtos de amplificação indicativos da presença de sequências de genomas virais em nove lotes de macerados de mosquitos rastreados levou à

3. Resultados

tentativa de isolamento dos mesmos, utilizando culturas de células de inseto, especificamente da linha celular C6/36 (descrito na secção 2.3.1.). De forma a tentar gerir e rentabilizar os custos e o trabalho inerentes à realização dos ensaios propostos, foi feita uma seleção prévia dos lotes de macerados de mosquitos a isolar em cultura, tendo em conta a diversidade de espécies de mosquitos para os quais os resultados obtidos eram indicativos da presença de sequências de negevírus. Para tal, dos nove lotes de macerados identificados durante os rastreios foram selecionados sete, correspondentes aos lotes 183, 204, 292, 390, 392, 539 e 730, para que houvesse uma representação diversificada das várias espécies de mosquito em estudo. Adicionalmente, foram analisados três lotes de macerados anteriormente analisados no laboratório de Virologia do IHMT e identificados com os códigos 207, 350 e 595. Estes três lotes eram compostos por mosquitos fêmeas (adultos) da espécie *Oc. caspius* (Costa, 2011) e revelaram a presença de flavivírus de insetos, especificamente OCFV_{PT}, sendo que, dois dos macerados, identificados com os códigos laboratoriais 207 e 350, revelaram também a presença de negevírus (Ferreira *et al.*, 2013). Na totalidade foram analisados dez lotes de macerados, de onde, potencialmente se poderiam vir a isolar negevírus.

Para a maioria dos lotes (à exceção dos lotes 595 e 730) foram efetuadas duas passagens cegas, no final das quais se tornaram muito evidentes efeitos citopáticos. A avaliação do CPE foi efetuada através de uma comparação entre culturas de células expostas a alíquotas dos macerados de mosquitos correspondentes a cada um dos lotes selecionados para esta segunda etapa do trabalho, e células não infetadas, utilizadas como controlo negativo.

Dos dez lotes analisados, as células expostas ao macerado correspondente ao lote 595, no qual se tinha verificado anteriormente a presença do flavivírus OCFV_{PT} (Ferreira *et al.*, 2013), revelaram um CPE característico de ISF, que quando comparado às células do controlo negativo (Figura 14A), revelou ser ligeiro, e caracterizou-se essencialmente por uma paragem do crescimento celular e formação de alguns agregados celulares (Figura 14B). Os lotes de macerados 207 e 350 foram igualmente selecionados para o isolamento viral, dado que nestes, a presença de genomas de negevírus, para além do de OCFV_{PT}, tinha sido revelada por RT-PCR (Ferreira *et al.*, 2013). Curiosamente, embora o CPE observado nas células expostas ao macerado do lote 207, que foi em tudo muito semelhante ao lote 350, tenha revelado características

anteriormente descritas para as células expostas ao macerado 595 (isto é CPE típico de flavivírus), revelou também uma diminuição do tamanho das células, associada a um arredondamento das mesmas (Figura 14C).

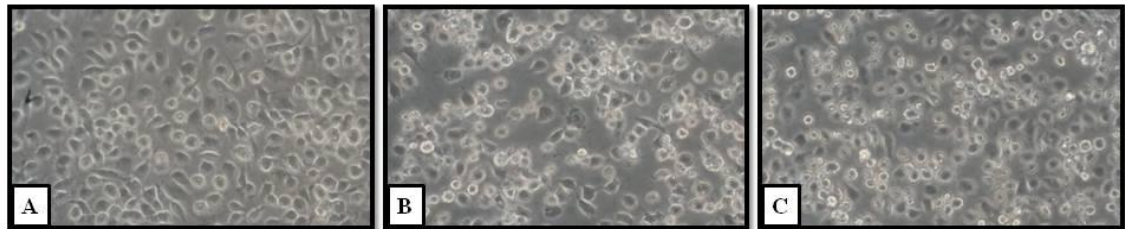


Figura 14 – Observação por microscopia ótica (ampliação de 400x) de células C6/36 não infetadas (A) e 72h após infeção com uma alíquota do macerado 595, na qual foi detetada a presença de flavivírus (B) e do macerado 207, no qual foi detetada a presença de flavivírus OCFV_{PT} em simultâneo com negevírus (C).

As culturas celulares expostas aos macerados dos restantes lotes analisados (183, 204, 292, 390, 392, 539 e 730), revelaram CPE com características muito semelhantes, embora as células expostas aos macerados dos lotes 183, 204, 292, 390, 392 e 539 tenham apresentado um CPE menos extenso comparativamente às células expostas ao macerado do lote 730. Por comparação com as células do controlo negativo (Figura 15A) constatou-se que 24 horas após o início da infeção com uma alíquota do macerado 730, o CPE observado era evidente e extenso, e que a grande maioria das células se encontravam desagregadas da monocamada que formavam inicialmente, destacando-se do suporte físico e tornando-se aparentemente menores e mais arredondadas (Figura 15B). Este efeito foi-se tornando mais severo com o decorrer da replicação viral, de tal forma que 48 horas após a infeção verificou-se o destacamento da quase totalidade das células do suporte e a formação de vários aglomerados celulares (Figura 15C). Decorridas 72 horas após a infeção, o CPE foi generalizado em toda a cultura infetada (Figura 15D). As células expostas ao macerado correspondente ao lote 730 foram as que apresentaram um CPE mais semelhante àquele que foi anteriormente observado como indicativo da replicação de negevírus (Ferreira *et al.*, 2013), o qual se veio a confirmar (ver secção 3.4.).

3. Resultados

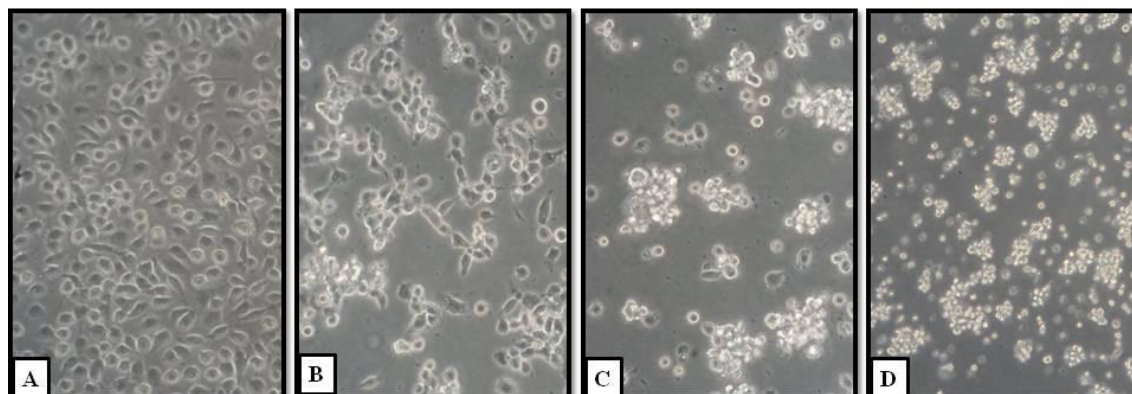


Figura 15 – Observação por microscopia ótica (ampliação de 400x) de células C6/36 não infetadas (A) e 24h (B), 48h (C) e 72h (D, ampliação de 200x) após infeção com um macerado 730 de mosquitos da espécie *Cx. univittatus*.

A tentativa de caracterização dos vírus isolados, e a avaliação da eventual presença de mais do que um vírus (flavivírus) num mesmo sobrenadante de cultura (coisolamento) foi efetuada mediante a amplificação de parte dos seus genomas por RT-PCR, utilizando extratos de cDNA preparados a partir dos sobrenadantes de cultura referentes a cada um dos lotes de mosquitos, a partir dos quais se tentaram isolar vírus. Análises anteriores permitiram constatar a presença de mais do que um vírus em sobrenadantes de culturas expostas a alguns macerados de *Oc. caspius*, enquanto que noutros foi apenas detetada a presença (com consequente isolamento em culturas celulares C6/36) de OCFV_{PT} (Ferreira *et al.*, 2013). Por essa razão, neste ensaio foi utilizada uma abordagem semelhante, tendo sido testada a presença quer de flavivírus, quer de negevírus, utilizando diferentes conjuntos de *primers*, entre os quais 1NS5F/1NS5R e 2NS5F/2NS5R (Vázquez *et al.*, 2012), que permitiam amplificar parte da sequência codificante da proteína NS5 de flavivírus (igualmente codificante para a RdRp viral); NegF/NegR, anteriormente referido no rastreio de sequências de negevírus e NeginF/NeginR, o qual tinha permitido, anteriormente, a amplificação específica de parte do genoma de um negevírus (igualmente codificante de parte da RdRp viral), isolado de um macerado de mosquitos da espécie *Oc. caspius* (OCNV₁₇₄) no laboratório de Virologia do IHMT (Ferreira *et al.*, 2013).

O ensaio de deteção de sequências virais através da sua amplificação por RT-PCR usando os *primers* LorFout/LorRout e DenzF/DenzR não revelou a presença de

produtos de amplificação em nenhum dos extratos de cDNA preparados a partir de cada sobrenadante de cultura dos lotes de macerados analisados.

Quanto aos resultados de amplificação por RT-PCR de parte da sequência codificante para o domínio da polimerase viral, localizado no extremo carboxilo da ORF1, estes sugeriram, de facto, a presença de genomas de negevírus no sobrenadante de sete culturas expostas aos macerados dos lotes 183, 204, 207, 292, 350, 390, 392, 539 e 730. Em cada extrato de cDNA, preparado a partir dos sobrenadantes expostos aos macerados dos referidos lotes, foi possível observar a presença de fragmentos de amplificação específica, com aproximadamente 1260 pb e 1000 pb, correspondentes aos tamanhos esperados para fragmentos amplificados, com recurso aos pares de *primers* NegF/NegR e NeginF/NeginR, respetivamente (Figuras 16A e C). Todos os produtos de amplificação se caracterizaram pela presença de bandas intensas, em particular no extrato referente ao lote 730 (Figura 16A), provavelmente sugerindo um título viral elevado. Dada a especificidade, e abundância, dos produtos de amplificação obtidos a partir do sobrenadante de células expostas ao macerado do lote 730, e o CPE profuso observado 48 horas após infeção de células C6/36 (Figura 15C), optou-se por não efetuar uma segunda amplificação (usando NeginF/NeginR), assumindo-se a presença de negevírus no sobrenadante de cultura em causa. O lote 595 também não foi rastreado com o referido par de *primers*, dado tratar-se de um lote no qual a presença de flavivírus e ausência de negevírus tinha sido anteriormente confirmada (Ferreira *et al.*, 2013).

O rastreio efetuado com os pares de *primers* que permitiam amplificar parte da sequência do gene NS5 de flavivírus indicou a presença de presumíveis genomas virais nos sobrenadantes de cultura expostos a cinco lotes de macerados de mosquitos: 183, 207, 350, 539 e 595. A análise de extratos de cDNA preparados a partir dos respetivos sobrenadantes de culturas de células C6/36 infetadas, permitiu a deteção de fragmentos de amplificação com as dimensões antecipadas, de acordo com o par de *primers* usado, isto é aproximadamente 1100 pb (1NS5F/1NS5R) e 1000 pb (2NS5F/2NS5R), os quais seriam indicativos da presença de sequências de ISF (Figuras 16B e D). Os resultados obtidos relativamente à deteção de vírus nos sobrenadantes de culturas expostas a alíquotas dos lotes 207, 350 e 595 confirmaram observações anteriores (Ferreira *et al.*, 2013), revelando a presença de flavivírus.

3. Resultados

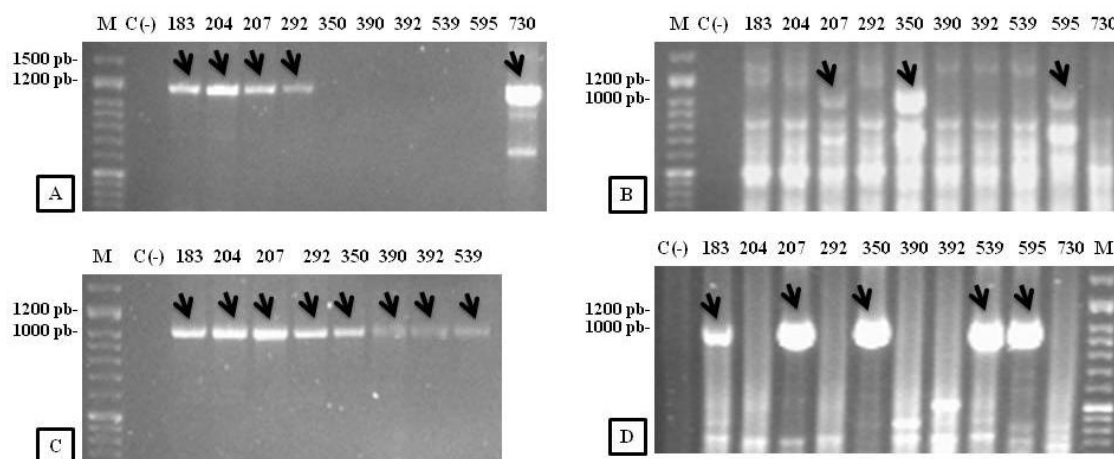


Figura 16 – Identificação da presença de genomas de negevírus e flavivírus por RT-PCR em extratos de cDNA preparados a partir de sobrenadantes de cultura após isolamento viral. Eletroforese em gel de agarose 1 % (p/v) dos resultados das reações de amplificação utilizando os pares de *primers* NegF/NegR (A) e NeginF/NeginR (C) e os pares de *primers* 1NS5F/1NS5R (B) e 2NS5F/2NS5R (D). M – Marcador de massas moleculares: NZYDNA Ladder VI (NZYtech, Portugal).

No total, foi possível identificar a presença potencial de genomas de negevírus em seis sobrenadantes de cultura obtidos após o seu isolamento, a partir de macerados constituídos por mosquitos das espécies *Oc. caspius* (183, 207, 350, 390 e 539), *Cx. pipiens* (204 e 292), *Cx. theileri* (392) e *Cx. univittatus* (730), traduzidos não só pelas características do CPE observado, mas também, e sobretudo, pela presença de fragmentos de amplificação específica de sequências virais. Verificou-se, também, a presença sugestiva de genomas de flavivírus em cinco sobrenadantes de cultura, todos infetados com macerados constituídos por mosquitos da espécie *Oc. caspius* (183, 207, 350, 539 e 595) e a presença concomitante de genomas de negevírus e flavivírus em sobrenadantes de cultura correspondentes ao isolamento de quatro lotes de macerados constituídos por mosquitos da espécie *Oc. caspius* (183, 207, 350 e 539).

3.3. Análises filogenéticas das sequências de negevírus obtidas

Análises filogenéticas das sequências codificantes para parte da ORF1 viral foram efetuadas após a obtenção de fragmentos de amplificação por utilização de três pares de *primers* (NeginF/NeginR, F11/NegPolR e F11/R11). Estes permitiram a

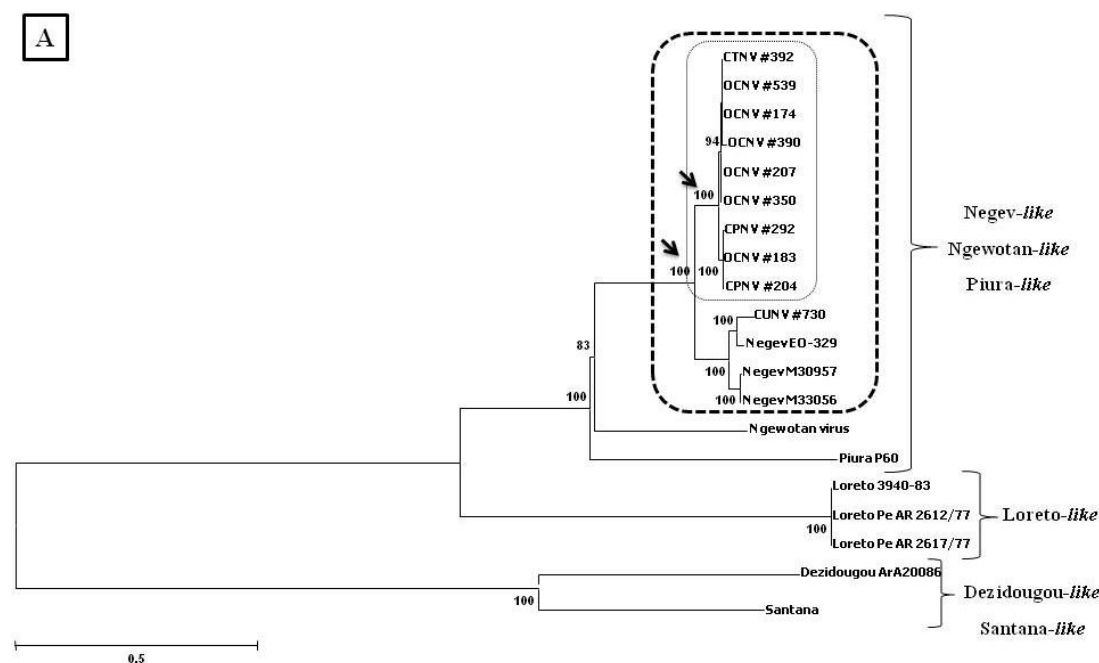
amplificação por RT-PCR de fragmentos com, aproximadamente, 1000 pb, 1200 pb e 1800 pb, respetivamente, utilizando extratos de cDNA preparados a partir dos sobrenadantes de cultura dos lotes a partir dos quais foram isolados presumíveis negevírus. Após sequenciação destes fragmentos foram efetuados alinhamentos das respetivas sequências nucleotídicas, recorrendo igualmente ao uso de sequências de negevírus disponíveis para consulta pública na data da análise, identificados com os números de acesso JQ675605, JQ675608 e JQ675609 (*Negev Virus*), JQ675610, JQ675612 e JQ675611 (*Loreto Virus*), JQ686833 (*Ngewotan Virus*), JQ675607 (*Piura Virus*), JQ675604 (*Dezidougou Virus*) e JQ675606 (*Santana Virus*). Foi igualmente utilizada a sequência parcial do gene que codifica para a RdRp do negevírus OCNV₁₇₄ (HF913429) anteriormente obtida no laboratório de Virologia do IHMT (Ferreira *et al.*, 2013). As relações filogenéticas foram inferidas com base na construção de árvores pelos métodos junção de vizinhos e máxima-verosimilhança. Utilizou-se, no primeiro caso, uma matriz de distâncias genéticas corrigida com o modelo de substituição Kimura 2-Parâmetros, ao passo que no segundo caso, referente à reconstrução de filogenias baseada no critério de máxima-verosimilhança foi tido em consideração o modelo GTR+I+ Γ , selecionado segundo o critério de informação de Akaike (tal como descrito na secção 2.17.).

Numa primeira análise foram construídas duas árvores a partir de alinhamentos de sequências de negevírus já publicadas e dez sequências nucleotídicas com aproximadamente 1000 pb, (Figuras 17A e B), obtidas após sequenciação de fragmentos amplificados com o par de *primers* NeginF/NeginR (lotes 183, 204, 207, 292, 350, 390, 392, 539, 595 e 730). Ambas as árvores revelaram congruência generalizada quando comparadas entre si e, à semelhança dos resultados obtidos anteriormente (Vasilakis *et al.*, 2013; Auguste *et al.*, 2014; Nabeshima *et al.*, 2014) foi possível identificar três grupos monofiléticos, todos estatisticamente bem suportados com valores de *bootstrap* superiores a 85 %. Um deles revelou ser constituído por sequências de vírus de tipo Negev, do qual fazem igualmente parte os vírus Ngewotan e Piura, outro constituído por vírus Loreto e o último por vírus Dezidougou e Santana (Figura 17A). Curiosamente, a maioria das sequências dos fragmentos amplificados, bem como a sequência do OCNV₁₇₄, resultaram na formação de um novo grupo monofilético, estatisticamente bem suportado por valores de *bootstrap* de 100 %, o qual, por sua vez partilhava o

3. Resultados

mesmo ancestral comum que o grupo monofilético representado pelos vírus Negev, formando um único grupo monofilético com este, suportado com valores de *bootstrap* de 100 % (Figura 17A). Por sua vez, o novo grupo monofilético identificado revelou estar subdividido em dois outros subgrupos, um dos quais, constituído pela sequência do OCNV₁₇₄ e por sequências de vírus obtidas a partir dos lotes 392, 539, 207, 350, e 390 e o outro, por sequências de vírus obtidas dos lotes 183, 204 e 292, ambos topologicamente bem suportados com valores de *bootstrap* de 94 % e 99 %, respetivamente (Figura 17B).

A sequência do fragmento obtido a partir do sobrenadante do lote 730 foi a única que apresentou características mais distintas das demais analisadas, formando um grupo monofilético, igualmente bem suportado com valores de *bootstrap* superiores a 99 %, com uma sequência atualmente descrita representada pelo número de acesso EO-329 (Figura 17B).



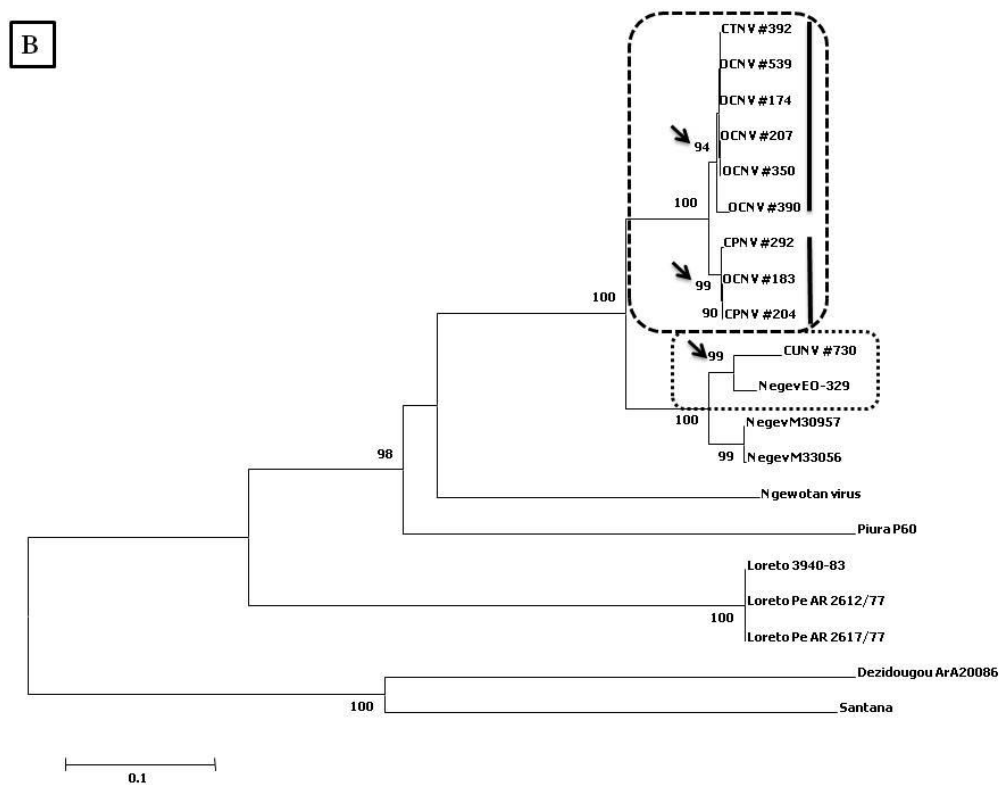


Figura 17 – Relação filogenética entre sequências de negevírus baseada num alinhamento de sequências nucleotídicas correspondentes a uma secção da polimerase viral, com aproximadamente 1000 pb. Árvores filogenéticas construídas com base no critério de máxima verosimilhança (ML) utilizando como modelo evolutivo GTR+I+ Γ (A) e com base no método de junção de vizinhos (NJ) utilizando como modelo de substituição Kimura 2-Paramêtros (B). A consistência topológica das foi avaliada com base numa análise de *bootstrapping* baseada em 100, ou 1000 amostragens aleatórias dos dados iniciais (respetivamente para ML e NJ). A barra horizontal representa percentagem de distância genética.

Numa segunda abordagem, foram selecionados três lotes, 183, 204 e 730 constituídos por macerados de mosquitos de diferentes espécies, *Oc. caspius*, *Cx. pipiens* e *Cx. univittatus* respetivamente, e foram construídas novas árvores a partir de alinhamentos entre sequências de maiores dimensões (com aproximadamente 2400 pb cada), decorrentes da sequenciação de produtos de amplificação obtidos por sobreposição das sequências dos amplicões obtidos com os pares de *primers* NeginF/NeginR, F11/NegPolR e F11/R11. As árvores construídas com base em diferentes métodos e modelos revelaram resultados consistentes entre si, e semelhantes aos resultados obtidos anteriormente, tal como se ilustra na figura 18.

3. Resultados

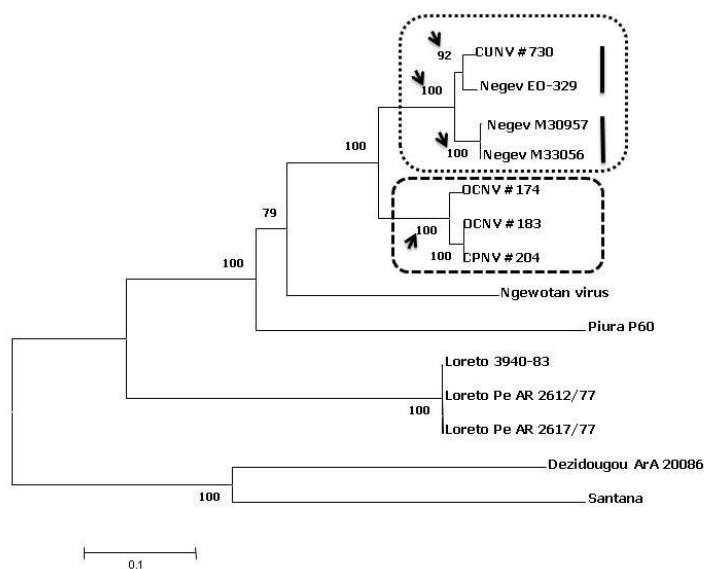


Figura 18 – Relação filogenética entre sequências de negevírus baseada num alinhamento de sequências nucleotídicas correspondentes a uma secção da polimerase viral, com aproximadamente 2400 pb. Árvore filogenética construída com base no método de junção de vizinhos (NJ) utilizando como modelo de substituição Kimura 2-Parâmetros cuja consistência topológica foi avaliada com base numa análise de *bootstrapping*, usando 1000 amostragens aleatórias dos dados iniciais.

A análise da árvore filogenética, construída segundo o método de junção de vizinhos, usando como modelo de substituição Kimura 2-Parâmetros, permitiu constatar que a sequência do fragmento amplificado a partir do sobrenadante do lote 183 isolado em cultura, bem como do lote 204, constituíram um grupo monofilético, estatisticamente bem suportado, com valor de *bootstrap* máximo (100 %), do qual fazia parte a sequência do OCNV₁₇₄. A sequência do fragmento amplificado obtido a partir do sobrenadante de cultura exposto a uma alíquota do lote 730 revelou pertencer ao grupo monofilético representado pela sequência do vírus Negev EO-329, Negev M30957 e Negev M33056 baseado em valores de *bootstrap* de 100 %, garantindo robustez topológica. Por sua vez, e à semelhança do resultado obtido nas árvores anteriores (Figuras 17A e B) a referida sequência revelou formar um subgrupo monofilético, com 92 % de robustez topológica com a sequência do vírus Negev EO-329.

Em suma, o estudo das relações filogenéticas das várias sequências analisadas revelou a existência de dois grupos monofiléticos distintos e de maior destaque. Um deles, constituído pela maioria das sequências analisadas e pela sequência do OCNV₁₇₄.

Um outro seria então constituído pela sequência do CUNV₇₃₀ e as sequências de Negev EO-329, Negev 30957 e Negev 33056, anteriormente caracterizadas (Vasilakis *et al.*, 2013). Embora estes dois grupos se tenham destacado de forma individualizada, pertencem a um único grupo monofilético, estatisticamente bem suportado nas três árvores (*bootstrap* de 100%), do qual fazem parte todos os vírus geneticamente semelhantes aos isolados Negev, anteriormente isolados de diferentes espécies de mosquitos hospedeiros (*An. coustani*, *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. coronator* e *Oc. caspius*) coletados em regiões geográficas tão distintas como Israel, Estados Unidos da América e Portugal. De acordo com estes resultados, o vírus CUNV₇₃₀, foi selecionado para ser estudado de forma mais aprofundada e detalhada tendo, para tal, sido obtida a sequência quase completa do seu genoma (B. do Bem Conceição, comunicação pessoal). Dado que o OCNV₁₇₄ já fora, anteriormente isolado e o seu genoma sequenciado na sua quase totalidade (R. Parreira, comunicação pessoal), e tendo este correspondido ao primeiro isolado de negevírus obtido no laboratório de Virologia do IHMT (Ferreira *et al.*, 2013), o mesmo foi utilizado como modelo nos estudos de avaliação de cinética de replicação viral de negevírus, análise por TEM dos CPE induzidos em células C6/36, indução de apoptose em células de inseto infetadas e expressão de proteínas virais durante a replicação viral.

3.4. Características ultraestruturais associadas à replicação viral do OCNV₁₇₄ em cultura de células

Em virtude do coisolamento de OCFV_{PT} e OCNV₁₇₄, presentes com diferentes títulos virais num mesmo sobrenadante de cultura de células C6/36, tornou-se necessário esclarecer se o CPE exuberante observado se devia ao somatório dos CPE provocados pela replicação de ambos os vírus ou, maioritariamente à replicação do OCNV₁₇₄. Deve salientar-se que a proximidade filogenética de OCFV_{PT} relativamente a HANKV (do inglês *Hanko virus*; Huhtamo *et al.*, 2012) lhe atribuíra características de baixa virulência, sugerindo que o OCFV_{PT} não deveria ser responsável pela grande parte dos CPE observados em culturas coinfectadas com OCFV_{PT} e OCNV₁₇₄. Por esta razão,

3. Resultados

o primeiro foi eliminado por diluição limite, técnica esta que permitiu manter o OCNV₁₇₄ num sobrenadante de cultura (onde ambos estavam inicialmente presentes), de forma a permitir que a sua replicação em células C6/36 pudesse ser estudada de forma individualizada.

As alterações morfológicas provocadas pela replicação de OCNV₁₇₄ em culturas de células C6/36 foram avaliadas mediante observação por microscopia (ótica e electrónica) destas células, 48 horas após infeção, dado corresponder ao ponto no decorrer na infeção, em que o CPE observado traduzia praticamente todas as suas características, as quais foram mantidas com o estender da infeção ao longo do tempo.

Tanto quanto o registo de microscopia ótica permitiu revelar, foi possível identificar um CPE profuso e evidente em células C6/36 infetadas com OCNV₁₇₄ (Figura 19). Por comparação com células C6/36 não infetadas (Figura 19A) foi possível verificar, à semelhança do CPE observado em células expostas ao macerado do lote 730 (Figura 15), a presença de CPE óbvio 48 horas após o início da infeção, o qual se caracterizou por um retardamento do crescimento celular, destacamento da maioria das células do suporte físico bem como o arredondamento das mesmas, e formação de agregados celulares abundantes e de grandes dimensões (Figura 19B).

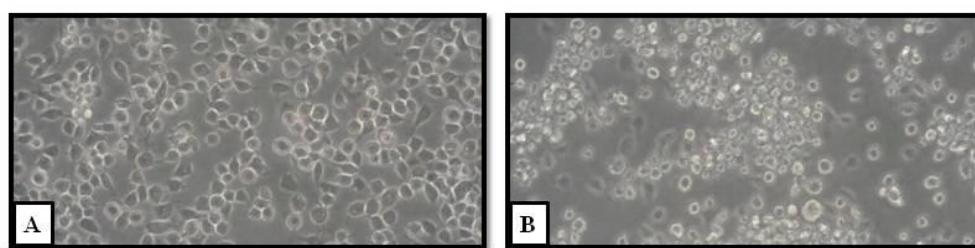


Figura 19 – Alterações morfológicas induzidas pela replicação viral do OCNV₁₇₄ em células C6/36. Observação por microscopia ótica (ampliação de 400x) de células C6/36 não infetadas (A) e 48h após infeção com o OCNV₁₇₄ (B).

Relativamente aos registos de TEM, a análise de secções finas de células C6/36 infetadas com OCNV₁₇₄ permitiu verificar, por comparação com células não infetadas (Figura 20A), e tal como anteriormente descrito (Ferreira *et al.*, 2013) a ocorrência de hiperplasia nuclear (Figura 20B) e alargamento do espaço intersticial do invólucro nuclear (Figura 20C), devido à acumulação de múltiplas vesículas de dimensões variadas (identificadas por Ves na Figura 20C), bem como de uma rede complexa de

estruturas tubulares com aproximadamente 20-30 nm de diâmetro (Figura 20D), frequentemente associadas a mitocôndrias (identificada por Mit na Figura 20C). Neste espaço intersticial foi possível observar, também, múltiplas estruturas semelhantes a esférulas, distribuídas pela periferia das vesículas e ao longo das estruturas tubulares (Figura 20E) ou, aparentemente, acumuladas em vesículas membranares individuais (Figura 20F).

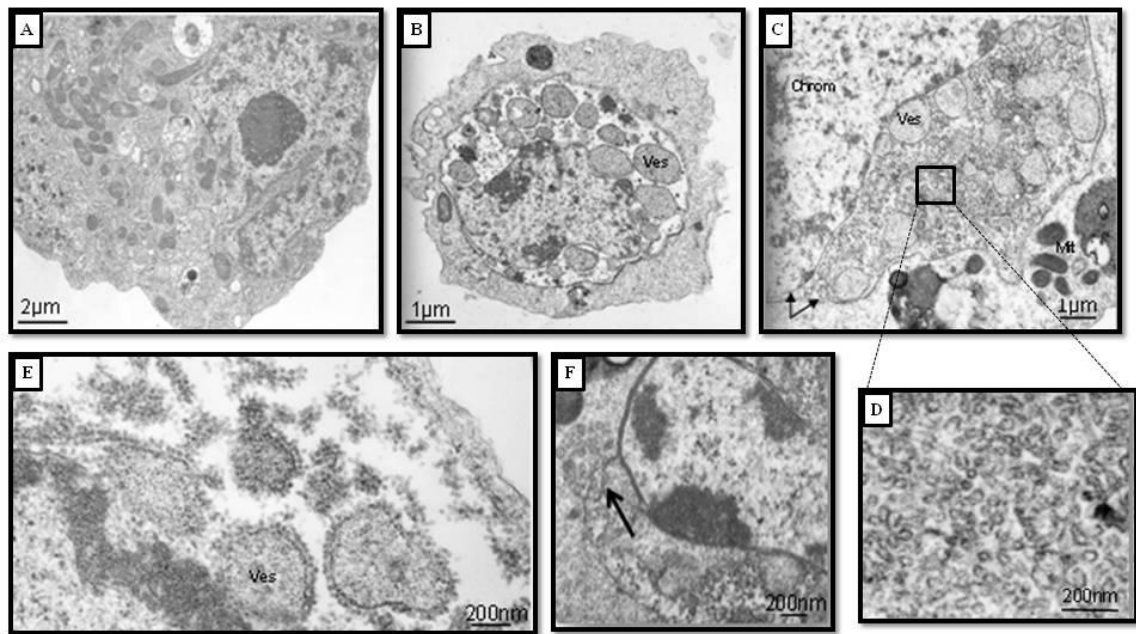


Figura 20 – Análise por microscopia eletrónica de transmissão de secções finas de células C6/36 não infetadas (A) e 48 horas após infeção com OCNV₁₇₄ (B – F). Observação de hiperplasia nuclear de células infetadas (B), e do afastamento dos dois folhetos que formam a dupla membrana lipídica do invólucro nuclear (setas em C). Acumulação de múltiplas vesículas no espaço intersticial (Ves em C) e presença de uma rede complexa de estruturas tubulares (D), frequentemente associadas à mitocôndria (Mit em C). Observação de múltiplas esférulas na periferia das vesículas e das estruturas tubulares no espaço intersticial do invólucro nuclear (E) ou a sua cumulação em vesículas individuais (F).

3.5. Expressão de proteínas virais durante a replicação viral do OCNV₁₇₄ em células C6/36: análise de perfis de proteínas solúveis totais por SDS-PAGE

Numa tentativa de justificar a origem das estruturas semelhantes a túbulos identificadas por TEM e de perceber se estas poderão resultar da formação de agregados de proteínas codificadas pelos genomas virais, foi avaliada a expressão de proteínas

3. Resultados

solúveis durante a replicação viral de OCNV₁₇₄, recorrendo, simplesmente, à análise dos perfis eletroforéticos de proteínas totais solubilizadas, em géis de SDS-PAGE. Seria de antecipar que, caso as estruturas fibrilares, cuja origem permanece por esclarecer até hoje, fossem resultado da polimerização de proteínas virais, estas pudessem vir a ser identificadas em géis de SDS-PAGE corados com azul de Coomassie, dado o número de células aparentemente infetadas. Neste sentido, foram utilizadas alíquotas de extratos proteicos preparados a partir da solubilização (em tampão de SDS-PAGE) de sedimentos de células C6/36 recolhidas a 24, 48 e 72 horas após infeção com OCNV₁₇₄ (como descrito na secção 2.7.). Como controlo, foram utilizados extratos proteicos de células não infetadas.

Inicialmente foi efetuado um ensaio exploratório para o qual foi utilizado um gel de SDS-PAGE com uma concentração constante de 12,5 % e extratos proteicos preparados a partir de células recolhidas após infeção com OCNV₁₇₄ em condições em que estas foram privadas de FBS. A razão para a privação do FBS deveu-se, essencialmente, à abundância de proteínas presentes no soro fetal e, em particular, de albumina sérica, as quais poderiam perturbar a migração das restantes proteínas solubilizadas presentes nas amostras analisadas. Para confirmá-lo, adicionalmente foram analisados outros dois extratos proteicos, preparados a partir de células colhidas 48 horas após a infeção com OCNV₁₇₄, num caso suplementadas com 2 % de FBS e noutro com 10 % de FBS. Os resultados obtidos permitiram constatar que o uso de 10 % de FBS em culturas de células C6/36 infetadas com OCNV₁₇₄ é, de facto, demasiado, uma vez que foi possível verificar uma distorção no perfil de migração das restantes proteínas (resultados não apresentados). No entanto, e por oposição, a utilização de meios de cultura totalmente desprovidos de FBS pareceu igualmente ser uma condição desfavorável, dado ser contraproducente à replicação viral. De facto, e embora tenha contribuído para um perfil eletroforético sem distorções provocadas pelo excesso de proteínas séricas, verificou-se ausência óbvia de CPE aquando a tentativa de replicação de OCNV₁₇₄ *in vitro*, o que indicia que a replicação viral possa ter sido consideravelmente afetada. Por último, o suplemento do meio de cultura com 2 % de FBS neste ensaio exploratório, foi tido como uma situação de compromisso, caracterizada pela presença de um perfil eletroforético sem grandes evidências de deformação devido ao excesso de proteínas séricas, tendo permitido, por outro lado, o

desenvolvimento de CPE óbvio, em associação com a replicação viral. No entanto, e independentemente das considerações referidas, não foi possível identificar a presença de bandas que pudessem ser distintamente apontadas como correspondendo a proteínas virais solúveis, refletindo o aumento da sua representatividade ao longo do tempo/em momentos específicos do ensaio, relativamente aos extratos contendo exclusivamente proteínas celulares.

Tendo em conta o tamanho esperado para os diferentes produtos virais, o ensaio exploratório não pareceu ser o melhor para garantir uma boa separação da maioria das proteínas presentes nos diferentes extratos proteicos. Assim, pelo facto da baixa resolução associada ao gel de concentração uniforme poder estar a condicionar a identificação das proteínas virais, optou-se, em análises subsequentes, por utilizar géis de gradiente contínuo. Para tal, foi utilizado um gel de SDS-PAGE de gradiente e acrilamida de concentração entre 7,5 % e 15 % e neste foram separadas as proteínas solúveis presentes nos extratos proteicos preparados a partir de células C6/36 infetadas com OCNV₁₇₄, enriquecidas com 2 % de FBS e recolhidas 24, 48 e 72 horas após a infeção. Adicionalmente, foram utilizados extratos proteicos de células não infetadas como controlo negativo.

Embora a análise comparativa dos perfis de proteínas solúveis totais observados em gel de gradiente de acrilamida de concentração entre 7,5 % e 15 % tivesse revelado uma franca melhoria na resolução da separação obtida (face à observada em gel de concentração única de 12,5 %), não permitiu a identificação de quaisquer bandas proteicas sugestivas de corresponderem a proteínas solúveis de origem viral em nenhum dos extratos preparados a partir de células recolhidas aos diferentes tempos após a infeção (Figura 21).

3. Resultados

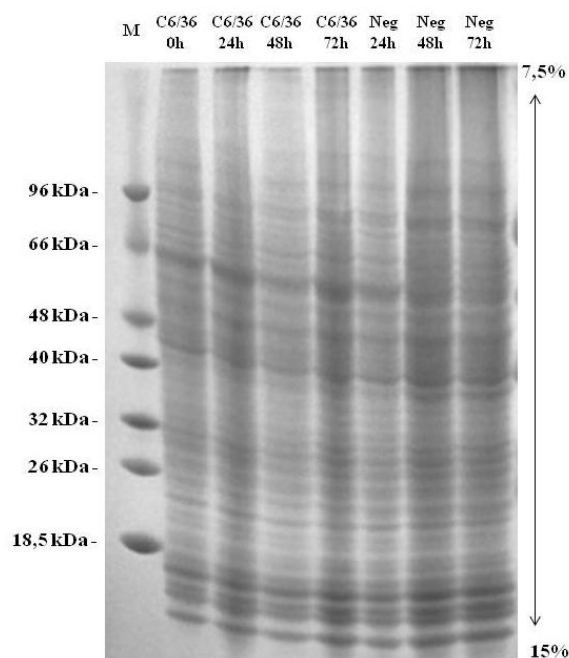


Figura 21 – Avaliação da presença de proteínas solúveis em extratos celulares infetados com OCNV₁₇₄ obtidos a partir de meios de cultura suplementados com 2 % de FBS e recolhidos a diferentes tempos após infeção (24, 48 e 72 horas). M – Marcador de massas moleculares: *Low Molecular Weight (LMW) protein marker* (NYTech, Portugal).

3.6. Indução de apoptose durante a replicação viral do OCNV₁₇₄ em células C6/36

Embora a análise por TEM de células C6/36, 48 horas após a infeção com OCNV₁₇₄ não tenha revelado a presença óbvia de grandes vacúolos citopáticos no citoplasma de células C6/36, a formação de corpos apoptóticos, hipercondensação da cromatina ou cisão nuclear, a sua formação foi amplamente sugerida em estudos anteriores (Vasilakis *et al.*, 2013; Auguste *et al.*, 2014). Dado que os efeitos acima descritos podem ser indicadores da entrada de células infetadas em apoptose, pretendeu avaliar-se se a replicação do OCNV₁₇₄ induzia, ou não, a apoptose de células C6/36. Essa avaliação foi efetuada mediante a análise do perfil eletroforético de extratos de DNA genómico total colhidos ao longo de uma cinética de infeção, nos quais foi analisada a eventual clivagem da cromatina em fragmentos inter-nucleossómicos, (como descrito na secção 2.5.). Foram analisados extratos de DNA correspondentes a células infetadas e não infetadas, colhidas ao fim de 24, 48 e 72 horas de incubação, e

paralelamente foi efetuado um registo fotográfico ao longo de toda a cinética de infeção. Como controlo negativo foram utilizados extratos de DNA correspondentes a células não infetadas.

Pela análise do perfil eletroforético obtido, foi possível verificar que apenas num dos extratos de DNA genómico analisado, correspondente a células infetadas com OCNV₁₇₄ recolhidas 72 horas após a infeção, foi possível detetar a presença de alguns fragmentos, com aproximadamente entre <500 e 1000 pb, sugestivos de corresponderem a fragmentos inter-nucleossómicos (Figura 22). Este resultado só foi possível de visualizar com o aumento considerável do contraste do gel, devido à reduzida abundância dos fragmentos em causa. Os restantes extratos, correspondentes a células infetadas recolhidas após 24 e 48 horas, não revelaram quaisquer destes fragmentos, nem mesmo com o aumento do contraste do gel.

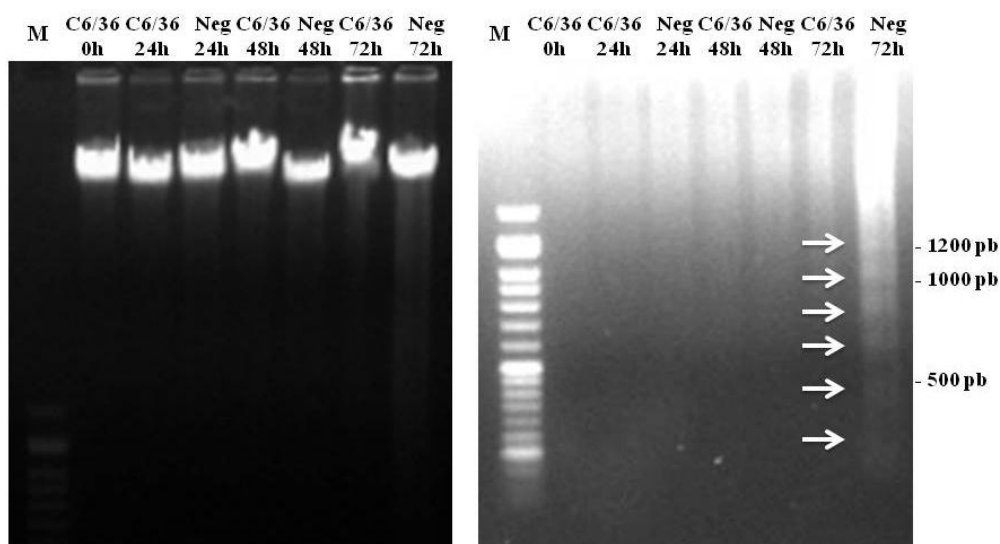


Figura 22 – Avaliação da indução de apoptose durante a replicação viral do OCNV₁₇₄. Eletroforese em gel de agarose 0,8 % (p/v) do perfil eletroforético de extratos de DNA genómico total obtidos a partir de sedimentos de células não infetadas e infetadas com OCNV₁₇₄, recolhidas com diferentes tempos de incubação (0, 24, 48 e 72 horas). M – Marcador de massas moleculares: NZYDNA Ladder VI (NZYtech, Portugal).

3. Resultados

3.7. Cinética da replicação viral do OCNV₁₇₄ em células C6/36

Segundo os resultados obtidos por Vasilakis *et al.* (2013), ao usar como modelo o vírus Negev EO-329 e culturas celulares C6/36, 12 horas após a infeção o título viral atinge um pico máximo que se mantém aproximadamente constante durante 72 horas, sugerindo que a estabilização do número de genomas virais no sobrenadante de cultura é alcançada ao fim de 12 horas após a infeção. De facto, e num cenário paralelo, a replicação do OCNV₁₇₄ provoca um CPE óbvio 24-48 horas após o início da infeção de células C6/36 (ver secção 3.4.), sugerindo que a produção de um grande número de partículas virais deverá ocorrer de forma precoce. Assim, através da análise da replicação viral ao longo do tempo, pretendeu verificar-se se a aparente rapidez com que as células C6/36 parecem libertar vírus EO-329 se verificava igualmente para o OCNV₁₇₄. No entanto, optou por utilizar-se uma abordagem ligeiramente diferente da utilizada no ensaio anteriormente descrito (Vasilakis *et al.*, 2013), na medida em que, em vez de se efetuar a titulação dos vírus por ensaios de placas, procedeu-se à deteção de genomas virais nos sobrenadantes de cultura. Atendendo à aparente replicação veloz do vírus EO-329, decidiu igualmente encurtar-se a análise da replicação viral para tempos mais próximos do zero (0 horas após infeção) considerando que, também no caso do OCNV₁₇₄, o título máximo de vírus poderia vir a ser atingido poucas horas após o início da infeção.

A cinética de replicação do OCNV₁₇₄ foi efetuada mediante a amplificação parcial do genoma viral por RT-PCR usando PCR convencional e PCR em tempo real, e o par de *primers* F0/R0 (descrito na secção 2.4.), o qual permitia a obtenção de um produto de amplificação de aproximadamente 560 pb. Para tal, foram utilizadas alíquotas de sobrenadantes colhidos 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 8 horas após a infeção e, adicionalmente, foi utilizada uma alíquota correspondente a um sobrenadante colhido 48 horas após infeção (Figura 19B) como controlo positivo. A análise dos produtos de amplificação em gel de agarose permitiu observar a ocorrência de amplificação de um fragmento com o tamanho esperado, nas alíquotas correspondentes aos sobrenadantes colhidos nos tempos 4, 5, 6 e 8 horas após a infeção (Figura 23). Por oposição, este mesmo fragmento não foi observado nas reações de amplificação preparadas com extratos de cDNA obtidos a partir de sobrenadantes colhidos aos restantes tempos (0, 1, 2 e 3 horas). Tanto quanto a sensibilidade do método utilizado permitiu constatar, os

resultados obtidos revelaram que a replicação viral ocorre de forma muito rápida, uma vez que decorridas entre 3-4 horas após a infeção já são claramente detetados genomas virais no exterior das células. Além disso, a intensidade das bandas tem tendência a aumentar ao longo do tempo de infeção, sugerindo um aumento considerável de material genómico no exterior das células ao longo da infeção, decorrente da replicação viral. As bandas correspondentes aos fragmentos amplificados de extratos recolhidos 8 e 48 horas após a infeção, parecem possuir uma intensidade aproximadamente semelhante sugerindo que, eventualmente, próximo de 8 horas após o início da infeção deverá ser atingido o pico máximo de título viral, o qual, e por comparação ao que se verifica com o vírus Negev EO-329, se deverá manter no decurso da infeção.

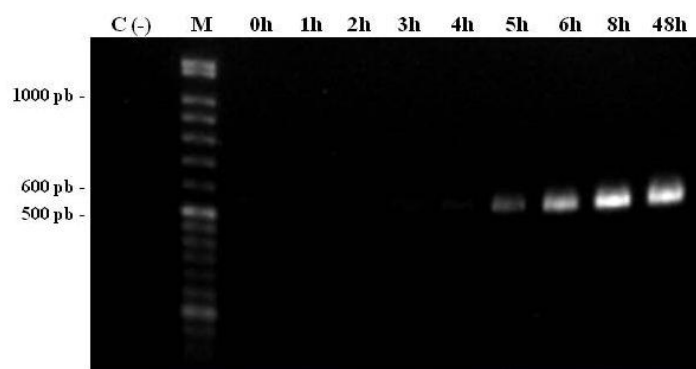


Figura 23 – Estudo da cinética da replicação viral do OCNV₁₇₄. Eletroforese em gel de agarose 0,8 % (p/v) dos produtos resultantes da amplificação por PCR convencional de extratos de RNA retrotranscritos preparados a partir de alíquotas de sobrenadantes de cultura colhidos a diferentes tempos após infeção (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 e 48 horas). M – Marcador de massas moleculares: NZYDNA Ladder VI (NZYtech, Portugal).

Dado que o uso do PCR convencional não permite acompanhar o processo de amplificação ao longo do tempo de uma forma quantitativa, limitando por isso a sensibilidade na deteção do momento em que as amplificações começam a ocorrer exponencialmente, o mesmo ensaio foi realizado recorrendo a PCR em tempo real, numa tentativa de aumentar a sensibilidade dos resultados anteriormente obtidos. Os resultados foram avaliados por uma análise comparativa dos valores de *Ct* (do inglês *cycle threshold*) associados a cada um dos pontos de colheita (Tabela 2), definido pelo

3. Resultados

número mínimo de ciclos necessários para ser atingido um valor de fluorescência correspondente a 2 unidades na reação efetuada para cada amostra.

Tabela 2 – Valores de C_t obtidos na reações de amplificação em tempo real para cada amostra, correspondentes a alíquotas de sobrenadantes de cultura colhidos com diferentes tempos após infeção (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 e 48 horas).

Amostras	$C(-)$	0 h	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	8 h	48 h
Valores de C_t	0	>30	>30	>30	29	26	25	22	20	20

Extratos de cDNA preparados a partir de sobrenadantes de cultura colhidos entre 0 e 2 horas após a infeção, para os quais foram obtidos valores de C_t iguais ou superiores a 30, foram considerados negativos para a presença de RNA de negevírus.

Ao longo da cinética de infeção, foi possível verificar que o extrato preparado a partir do sobrenadante recolhido 4 horas após o início da infeção revelou um valor de C_t já inferior a 30 ($C_t=26$), sugerindo a presença de genomas de negevírus no sobrenadante de cultura, à semelhança do resultado obtido anteriormente (Figura 23). Embora a sensibilidade do método utilizado não tenha permitido detetar a presença de potenciais genomas virais no sobrenadante recolhido 3 horas após o início da infeção, o valor de C_t obtido foi ligeiramente inferior a 30 ($C_t=29$), não excluindo a possibilidade de 3 horas após a infeção, ser possível detetar alguns genomas virais no exterior das células.

A partir das 5 horas de infeção, o valor de C_t teve tendência a diminuir ligeiramente, sugerindo um aumento gradual do número de genomas virais presentes no meio extracelular, traduzido por uma diminuição sucessiva do número de ciclos para atingir um mesmo valor de fluorescência, até atingir uma fase estacionária, altura em que o sistema atinge um estado de saturação e a variação dos valores de C_t é mínima (caso ocorra de facto).

3.8. Construção de vetor plasmídico recombinante com sequência de um promotor de transcrição reconhecido em células de inseto

O interesse pelo esclarecimento da estratégia replicativa dos negevírus e a tentativa de justificar as alterações morfológicas associadas ao sistema endomembranar, observadas por TEM, levaram à tentativa de construção de um vetor plasmídico recombinante, com capacidade de suportar a expressão de proteínas virais em células de inseto. Por sua vez, a construção deste vetor plasmídico permitiria a obtenção de novos plasmídeos de expressão, passíveis de serem avaliados em sistemas de culturas de células de inseto, permitindo, por exemplo, uma melhor compreensão da forma como evoluem, ou quais as proteínas virais diretamente implicadas, na génese dos CPE observados em células infetadas por negevírus.

A construção do vetor plasmídico recombinante pretendido foi efetuada utilizando como modelo de base o plasmídeo pIC111 (Cheeseman e Desai, 2005) que possui dois promotores: um promotor bacteriano, reconhecido por *E. coli* localizado a montante da sequência do gene que confere resistência à ampicilina aos clones que possuam este plasmídeo (ou seus derivados), e um promotor dos genes de expressão precoce-imediata do citomegalovírus humano (CMV), localizado a montante do gene da proteína EGFP (do inglês *Enhanced Green Fluorescent Protein*). O MCS (do inglês *Multiple Cloning Site*), onde se encontram as sequências reconhecidas por múltiplas endonucleases de restrição de tipo II, situa-se a montante do gene que codifica a EGFP (ver Anexo 2).

A construção de um novo vetor para expressão de proteínas em células de inseto incluiu a tentativa de clonagem da sequência do promotor de transcrição OpIE1, (promotor dos genes de expressão precoce-imediata do vírus da poliedrose de *Orgyia pseudotsugata*), presente no vetor pIZT/V5-His (Invitrogen, E.U.A.), a jusante do promotor do CMV reconhecido em células de vertebrado (mas não reconhecido em células de inseto) (Wu *et al.*, 2000).

Para a construção do vetor em causa procedeu-se à amplificação de um fragmento de aproximadamente 330 pb, incluindo a sequência do promotor OpIE1 (de acordo com o protocolo descrito na secção 2.11.1.), com recurso ao par de *primers* OpIE1-F/OpIE1-R. Este par de *primers* foi desenhado de forma a permitir a amplificação específica de todo o fragmento pretendido, sendo que, a estes *primers*, foi

3. Resultados

adicionada uma sequência sinalizadora (em inglês *tag*) em cadeia simples, incluindo os locais de reconhecimento de enzimas de restrição de tipo II (*NheI* e *HindIII*), utilizadas na sua clonagem subsequente em pIC111 (Tabela 1). As enzimas de restrição utilizadas no processo de clonagem foram estrategicamente selecionadas de modo a reconhecerem/clivarem sequências alvo localizadas no MCS, de forma a viabilizar a clonagem de outros fragmentos a jusante deste promotor.

Os resultados da amplificação com o par de *primers* OpIE1-F/OpIE1-R foram analisados mediante eletroforese em gel de agarose e revelaram a presença de um fragmento, caracterizado por uma banda intensa com aproximadamente o tamanho esperado (Figura 24A). A banda correspondente ao fragmento amplificado foi excisada do gel e o fragmento de DNA em causa purificado (ver secção 2.16.1.). As digestões enzimáticas com as enzimas de restrição *HindIII* e *NheI* (como descrito na secção 2.12.) quer do fragmento de DNA correspondente ao promotor OpIE1, quer do vetor pIC111, foram efetuadas de forma sequencial, intercaladas por uma reação de diálise. Pelo facto do vetor pIC111 ser circular e possuir uma dimensão de 6236 pb, a avaliação do resultado da reação de digestão com a enzima *HindIII* foi efetuada mediante a análise do plasmídeo na sua forma linear, por eletroforese em gel de agarose (Figura 24B). De acordo com o resultado da eletroforese, foi possível verificar a presença de um fragmento único, com aproximadamente 6200 pb, correspondente ao plasmídeo pIC111 linearizado. Devido à reduzida dimensão do fragmento do promotor OpIE1, o resultado da reação de hidrólise com a enzima *HindIII* não foi avaliado mediante eletroforese em gel de agarose, dada a dificuldade em distinguir o fragmento digerido do fragmento original, pelo que o sucesso da reação foi inferido a partir do sucesso da hidrólise do plasmídeo pIC111.

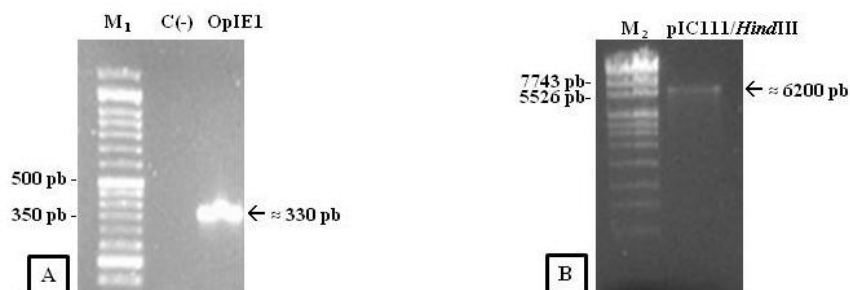


Figura 24 – Construção do vetor plasmídico recombinante com a sequência do promotor OpIE1. (A) Eletroforese em gel de agarose 1 % (p/v) do resultado da amplificação do fragmento correspondente ao promotor OpIE1 utilizando o par de *primers* OpIE1-F/OpIE1. (B) Eletroforese em gel de agarose 1,5 % (p/v) do resultado da digestão enzimática do plasmídeo pIC111 com a enzima *HindIII*. M₁ – Marcador de massas moleculares – *NZYDNA Ladder VI* (NZYtech, Portugal); M₂ – M – Marcador de massas moleculares – *Lambda – pUC Mix Marker 4* (Fermentas, Lituânia).

A avaliação do resultado das reações de digestão com a enzima *NheI* dos fragmentos correspondentes ao promotor OpIE1 e plasmídeo pIC111 previamente digeridos com a enzima *HindIII*, não foi efetuada mediante à análise do perfil de migração dos fragmentos em eletroforese em gel de agarose, dado que a dimensão dos fragmentos obtidos após digestão dupla seria insuficiente para avaliar o sucesso da mesma. Como tal, optou por efetuar-se uma avaliação final mediante sequenciação do vetor recombinante, caso a construção tivesse tido sucesso.

Após transformação de células de *E. coli NovaBlue* (descrito na secção 2.14.), verificou-se o crescimento de várias colónias isoladas, em placas de meio LB sólido suplementado com ampicilina, as quais foram aleatoriamente selecionadas e das quais foi extraído DNA plasmídico. A seleção de clones bacterianos potencialmente recombinantes foi efetuada mediante PCR convencional, utilizando o par de *primers* OpIE1-F/OpIE1-R. Na totalidade foi possível identificar dezasseis clones bacterianos possivelmente recombinantes, cujos extratos de DNA plasmídico permitiram revelar a presença de fragmentos de amplificação específica, identificados no gel de agarose por bandas com maior ou menor intensidade (Figura 25). Os extratos de DNA plasmídico correspondentes aos demais clones bacterianos analisados não sugeriram a inserção do fragmento do promotor OpIE1, devido à ausência de produtos de amplificação detetáveis no gel de agarose.

3. Resultados

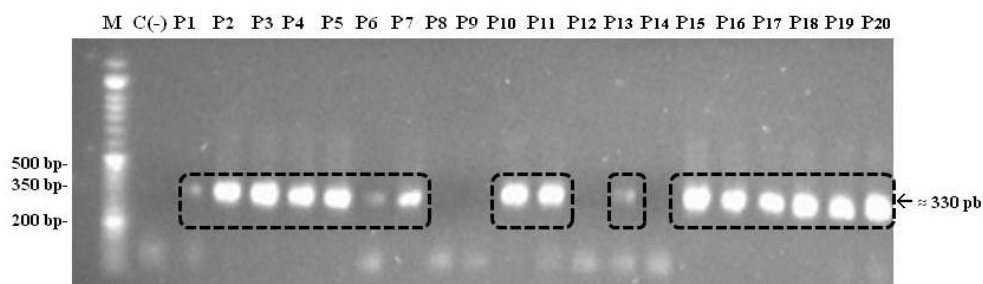


Figura 25 – Identificação de plasmídeos recombinantes contendo a sequência do promotor OpIE1 derivado do vetor pIZT/His-V5. Eletroforese em gel de agarose 1 % (p/v) de produtos de amplificação obtidos com o par de *primers* OpIE1-F/OpIE1-R. M – Marcador de massas moleculares – *NZYDNA Ladder VI* (NZYtech, Portugal).

Os plasmídeos recombinantes identificados por P4 e P20 foram aleatoriamente selecionados e sequenciados para avaliar a correta inserção do fragmento. O resultado da sequenciação de ambos os plasmídeos revelou que o fragmento do promotor OpIE1 foi inserido de forma correta no vetor pIC111, tendo o plasmídeo recombinante P4 sido utilizado como base para a construção de plasmídeos de expressão e adotado a designação de pIC111-V (dado tratar-se de uma variante do vetor originário pIC111).

3.9. Expressão de EGFP a partir do vetor pIC111-V em células eucariontes: análise por microscopia de fluorescência

A funcionalidade do vetor pIC111-V, obtido após a clonagem da sequência do promotor (OpIE1) para a transcrição constitutiva a partir do vetor pIC111, foi avaliada mediante a análise da expressão do gene repórter da EGFP por microscopia de fluorescência, após a transfeção de células das linhas celulares HEK293T e C6/36. As células HEK293T foram selecionadas como controlo do ensaio de transfeção na medida em que a transfeção das mesmas permitiria avaliar a estabilidade do pIC111-V e a interferência da expressão de EGFP a partir do promotor CMV na presença de um segundo promotor, OpIE1. As células C6/36 permitiriam avaliar a capacidade de expressão de EGFP a partir do promotor OpIE1 no vetor pIC111-V, reconhecido em células de inseto. O vetor pIC111 foi igualmente utilizado nos ensaios de transfeção

enquanto controlo positivo e negativo da transfeção de células HEK293T e C6/36, respetivamente.

A análise comparativa do contraste entre células HEK293T não transfetadas (Figura 26A) e transfetadas com o vetor pIC111 permitiu constatar que a taxa de transfeção foi elevada, tendo sido possível identificar várias células a expressar o gene da EGFP, e consequentemente a emitir fluorescência verde (Figura 26B). Quanto à transfeção de células HEK293T com o vetor pIC111-V, constatou-se que a taxa de expressão de EGFP foi extremamente baixa quando comparada com o controlo positivo. A grande maioria das células não expressou a proteína codificada pelo gene repórter, traduzindo-se este fenótipo numa intensidade da fluorescência emitida praticamente nula (Figura 26C).

Por sua vez, a transfeção de células C6/36 com o vetor pIC111 revelou, tal como seria de antecipar, que a maioria das células foi incapaz de expressar EGFP a partir do promotor CMV (Wu *et al.*, 2000), tendo-se verificado somente a presença de expressão basal de EGFP (Figura 26E). O mesmo não se verificou na mesma linhagem celular transfetada com pIC111-V uma vez que, apesar da taxa de transfeção obtida não ter sido consideravelmente elevada, várias foram as células que expressaram o gene da EGFP a partir do promotor OpIE1, conduzindo à emissão de fluorescência (Figura 26F).

3. Resultados

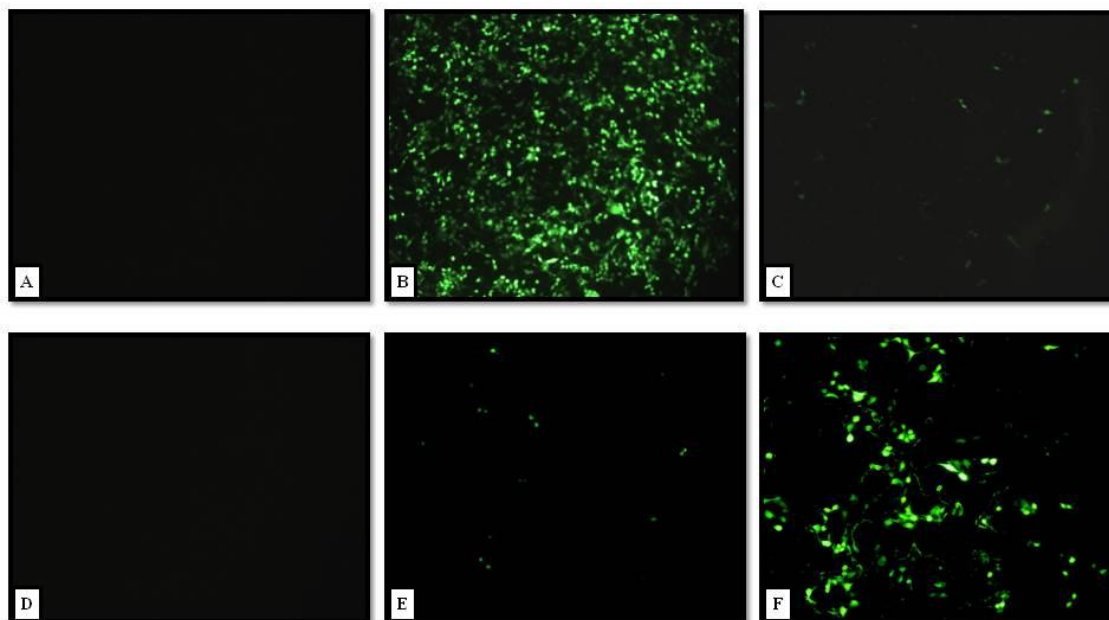


Figura 26 – Imagens de microscopia de fluorescência (ampliação 100x) do resultado da transfecção das linhas celulares HEK293T e C6/36 com o vetor plasmídico pIC111-V. Células HEK293T não transfetadas (A), transfetadas com pIC111 (B) e transfetadas com pIC111-V (C). Células C6/36 não transfetadas (D), transfetadas com pIC111 (E) e transfetadas com pIC111-V (F).

3.10. Construção de plasmídeos para expressão de proteínas codificadas pelas ORF1, ORF2 e ORF3 de OCNV₁₇₄ fundidas, em C-terminal, à EGFP

Após a construção do plasmídeo pIC111-V, foram tentativamente construídos três plasmídeos de expressão de forma a dar continuidade aos objetivos propostos, desta feita consistindo na análise dos eventuais efeitos (alterações morfológicas) decorrentes da expressão transitória de algumas proteínas codificadas pelo OCNV₁₇₄ (ou dos seus domínios) em células eucariontes. A construção dos plasmídeos de expressão consistiu na clonagem da sequência codificante do domínio de RdRp da ORF1 (domínio da polimerase viral), bem como das sequências codificantes completas das proteínas ORF2 e ORF3, fundidas em C-terminal com uma proteína repórter, neste caso a codificada pelo gene EGFP.

A posterior transfecção de células de vertebrado e invertebrado permitiria, por comparação dos padrões de fluorescência obtidos na sequência da expressão de

proteínas codificadas pelo referido plasmídeo nestes dois contextos celulares, averiguar, por exemplo, se os efeitos observados no sistema endomembranar durante a replicação viral do OCNV₁₇₄ são provocados por proteínas virais, ou se estas dependem de uma interação entre proteínas virais e celulares. Além disso, permitiria também identificar a possível localização da RdRp durante a replicação viral, bem como das proteínas ORF2 e ORF3.

Para a construção dos referidos plasmídeos de expressão foram utilizadas sequências parciais do genoma do OCNV₁₇₄, as quais começaram por ser amplificadas por RT-PCR, com recurso a três pares de *primers*, orf1BamHI/orf1NotI, orf2BamHI/orf2NotI e orf3BamHI/orf3NotI (Tabela 1), construídos de forma específica para amplificar fragmentos de aproximadamente 1300 bp, 1320 bp, e 620 bp, respetivamente e correspondentes às sequências codificantes de cada uma das proteínas/domínios pretendidos. Os *primers* foram desenhados com base no alinhamento das sequências de negevírus de tipo Negev identificadas pelos números de acesso JQ675605, JQ675608, JQ675609 e na de OCNV₁₇₄ (R. Parreira, comunicação pessoal). À semelhança dos *primers* OpIE1-R e OpIE1-F, os *primers* utilizados nesta etapa do trabalho realizado foram construídos com sequências *tag* em cadeia simples, as quais incluíram os locais de reconhecimento das enzimas de restrição *Bam*HI e *Not*I, selecionadas para a clonagem dos fragmentos referentes aos domínios genómicos em análise.

Através da análise dos resultados das reações de amplificação com os pares de *primers* orf1BamHI/orf1NotI, orf2BamHI/orf2NotI e orf3BamHI/orf3NotI, foi possível verificar a ocorrência de amplificação específica em todas as reações (efetuadas em duplicado) devido à presença de bandas, com aproximadamente, as dimensões esperadas para os produtos amplificados com os respetivos *primers* (Figura 27). Foi possível identificar duas bandas de aproximadamente 1300 pb (O1 e O1'), correspondentes à amplificação do fragmento referente ao domínio da polimerase viral da ORF1 do OCNV₁₇₄, duas bandas de aproximadamente 1320 pb (O2 e O2') correspondentes ao fragmento codificado pelo domínio da ORF2 e outras duas (O3 e O3'), de maior intensidade comparativamente às restantes, e de aproximadamente 620 pb, referentes à amplificação do fragmento codificado pelo domínio da ORF3.

3. Resultados

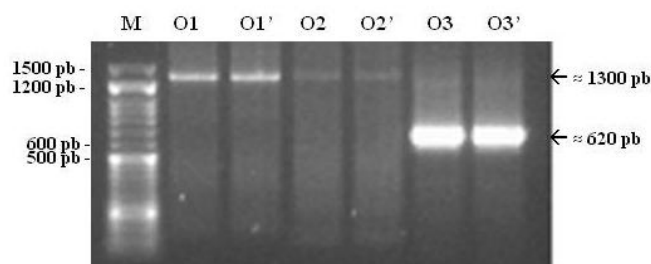


Figura 27 – Produtos de amplificação específica obtidos por RT-PCR a partir de extratos de RNA total e utilizando os pares de *primers* orf1BamHI/orf1NotI, orf2BamHI/orf2NotI e orf3BamHI/orf3NotI para amplificar sequências de domínios correspondentes às ORF1 (domínio da polimerase viral), ORF2 e ORF3, respetivamente do genoma do OCNV₁₇₄. Eletroforese em gel de agarose 1 % (p/v). M – Marcador de massas moleculares: *NZYDNA Ladder VI* (NZYtech, Portugal).

De forma a aumentar o rendimento obtido nas reações de amplificação do domínio da polimerase viral da ORF1 e do domínio da ORF2 procedeu-se à tentativa de otimização da temperatura de hibridação dos *primers* na reação de amplificação pretendida, aumento do tempo de extensão e uso de diferentes polimerases de DNA.

Apesar das inúmeras tentativas, os resultados foram reprodutivelmente semelhantes aos apresentados na figura 27. Como tal, e de modo a obter uma maior quantidade de DNA para os fragmentos referentes aos domínios em análise das ORF1 e ORF2, evitando assim perdas significativas dos fragmentos amplificados no processo de purificação, recorreu-se à estabilização dos mesmos no vetor plasmídico pJet1.2/*blunt* (descrito na secção 2.13.1.; ver Anexo 1), consequentemente evitando a sua repetida amplificação a partir de cDNA. Após transformação em células de *E. coli NovaBlue* foram obtidos vários clones recombinantes para ambos os fragmentos, confirmados pela presença de moléculas de DNA plasmídico com migração retardada face a plasmídeos desprovidos de inserto (P1, P1' e P1'', Figura 28A) e pela análise de perfis de restrição com a enzima *Bgl*II, no qual se esperava identificar fragmentos de aproximadamente 1300 pb e fragmentos maiores correspondentes ao plasmídeo linear (Figura 28B). Os resultados obtidos nos ensaios de estabilização do fragmento codificado pelo domínio da ORF2 foram semelhantes aos resultados obtidos para o fragmento codificado pelo domínio da polimerase viral, ilustrados nas figuras 28A e B.

Da totalidade de clones recombinantes obtidos para ambos os fragmentos, foram aleatoriamente selecionados quatro (dois para cada fragmento), identificados por pJ1,

pJ1', pJ2 e pJ2' para avaliar, por sequenciação, o sucesso da clonagem efetuada. Para tal, foram realizadas reações de amplificação por PCR convencional, usando o par de *primers* pJet1.2 F/pJet1.2 R (ver secção 2.13.1.), que permitiam amplificar fragmentos com aproximadamente o tamanho dos insertos (1300 pb e 1320 pb), no caso de ter havido inserção dos mesmos no vetor. Os resultados de amplificação revelaram a presença de três produtos de amplificação com aproximadamente o tamanho dos fragmentos, 1300 pb (pJ1, pJ2 e pJ2'), caracterizados por bandas bastante intensas, confirmando o sucesso da clonagem pretendida (Figura 28C). Curiosamente, para um dos clones (pJ1'), embora tenha sido possível observar um retardamento na migração no gel de agarose (P1', Figura 28A) indicativo da inserção da sequência do fragmento, codificado pelo domínio da polimerase viral, no vetor pJet1.2/*blunt*, não se observaram produtos de amplificação. Os clones recombinantes identificados por pJ1 e pJ2 foram aleatoriamente selecionados como vetores de estabilização dos fragmentos codificados pelo domínio da polimerase viral da ORF1 e pelo domínio da ORF2, a partir dos quais foi efetuada nova reação de amplificação, utilizando o par de *primers* pJet1.2 F/pJet1.2 R, seguida de excisão e purificação de ambos os fragmentos do gel.

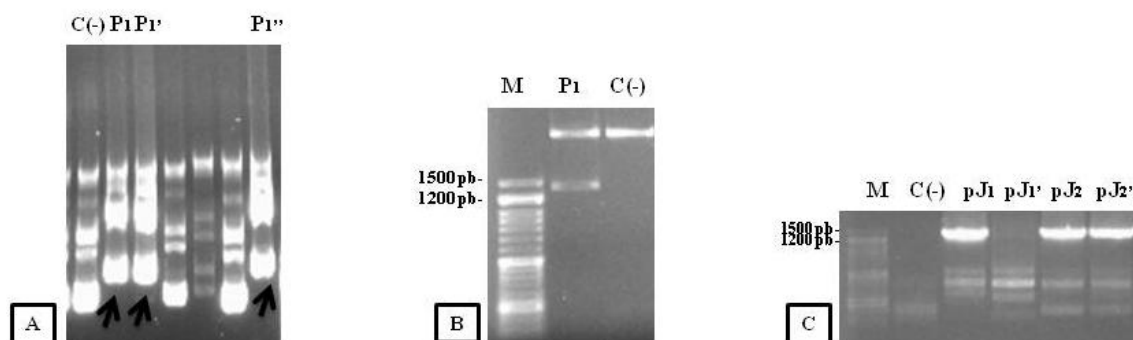


Figura 28 – Estabilização dos fragmentos do genoma viral do OCNV₁₇₄ codificados pelo domínio da polimerase viral presente na ORF1 e pelo domínio da ORF2 no vetor plasmídico pJet1.2/*blunt*. Perfil eletroforético de migração de DNA plasmídico extraído de clones potencialmente recombinantes com o fragmento referente ao domínio da polimerase viral da ORF1 (A) e respetiva digestão enzimática com *Bgl*III (B). Resultado da amplificação por PCR convencional utilizando dois clones potencialmente recombinantes com o fragmento codificado pelo domínio da polimerase viral (pJ1 e pJ1') e com o fragmento codificado pelo domínio da ORF2 (pJ2 e pJ2'), usando o par *primers* pJet1.2 F/pJet1.2 R (C). M – Marcador de massas moleculares – NZYDNA Ladder VI (NZYtech, Portugal).

3. Resultados

No sentido de dar continuidade ao processo de construção dos plasmídeos de expressão desejados, após obtenção e purificação dos três fragmentos a clonar no vetor recombinante pIC111-V, estes foram digeridos sequencialmente, e paralelamente à digestão do vetor recombinante pIC111-V com as enzimas *Bam*HI e *Not*I (como descrito na secção 2.12.). O resultado da digestão enzimática do vetor pIC111-V com *Not*I foi avaliado mediante eletroforese em gel de agarose, no qual se identificou uma única banda, com aproximadamente 6600 pb, representativa do vetor recombinante pIC111-V linearizado (6657 pb: 6326 pb do pIC111+ 331 pb do promotor OpIE1) e semelhante à banda ilustrada na figura 24B. À semelhança do procedimento efetuado anteriormente, aquando a construção do vetor recombinante pIC111-V, devido à reduzida dimensão dos fragmentos codificados pelos domínios de cada ORF, o sucesso da digestão enzimática dos mesmos foi inferido com base no sucesso da digestão enzimática do vetor. Posteriormente, e sob as mesmas condições foi efetuada uma segunda digestão enzimática com *Bam*HI tendo-se optado por avaliar o resultado somente após a obtenção, eventual, de um clone recombinante, por sequenciação.

A seleção de clones potencialmente recombinantes foi efetuada após transformação de uma estirpe hospedeira de *E. coli NovaBlue*, mediante a análise do perfil eletroforético de moléculas de DNA plasmídico de clones bacterianos individuais e subsequente identificação da presença de moléculas de migração retardada comparativamente ao vetor plasmídico pIC111, desprovido de inserto e considerado controlo negativo do ensaio. O padrão de migração foi semelhante ao representado na figura 28A e, na totalidade, foi possível verificar a ocorrência de apenas um clone potencialmente recombinante obtido com o fragmento que codifica a RdRp e vários clones potencialmente recombinantes com os fragmentos que codificam a ORF2 e ORF3, embora o perfil de migração obtido para o DNA plasmídico extraído de clones recombinantes com o fragmento codificante da ORF3, não tenha apresentado uma retardação tão óbvia como os demais, devido à pequena dimensão do referido fragmento (aproximadamente 620 pb para 1300/1320 pb).

A confirmação da presença de clones recombinantes com os fragmentos codificados pelo domínio da polimerase viral e pelos domínios das ORF2 e ORF3 foram efetuados mediante a análise do perfil de eletroforético dos três vetores após digestão com as enzimas *Bam*HI e *Not*I (descrito na secção 2.12.). A análise dos perfis obtidos

permitiu constatar que todos os clones analisados eram recombinantes, devido à presença de duas bandas referentes a cada clone, uma correspondente ao vetor recombinante pIC111-V sem inserto e outra ao inserto clonado. A figura 29 ilustra o perfil da digestão enzimática obtido para os clones com o fragmento codificante da ORF2 analisados, na qual foi possível identificar uma banda representativa do vetor pIC111-V sem inserto, com aproximadamente 6600 pb, e outra representativa do fragmento, com aproximadamente 1320 pb. O perfil obtido para os demais clones analisados foi semelhante, à exceção da dimensão dos insertos, que variou entre 1300 pb (domínio da polimerase viral) e 620 pb (domínio da ORF3).

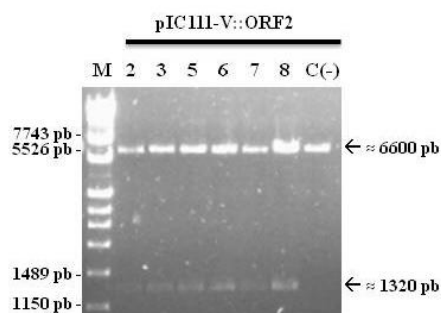


Figura 29 – Confirmação da presença da sequência referente ao domínio da ORF2 do genoma do OCNV₁₇₄ no vetor plasmídico pIC111-V. Eletroforese em gel de agarose 1 % (p/v) do resultado da digestão enzimática com *Bam*HI e *Not*I, dos clones potencialmente recombinantes com a sequência codificada pelo domínio da ORF2. M – Marcador de massas moleculares – *Lambda* – *pUC Mix Marker 4* (Fermentas, Lituânia).

Da totalidade de clones recombinantes com os três insertos pretendidos, foram aleatoriamente selecionados cinco (identificados por pIC111-V::ORF1 – 13; pIC111-V::ORF2 – 5 e 7; e pIC111-V::ORF3 – 7 e 11) para análise das suas sequências nucleotídicas. Após a extração de DNA plasmídico correspondente a cada clone selecionado, seguida de purificação dos mesmos (descrito na secção 2.16.2.) verificou-se que o rendimento de extração de DNA plasmídico contendo o fragmento codificante da polimerase viral era baixa, razão pela qual se optou pela utilização de um sistema comercial para purificar DNA plasmídico em baixo número de cópias (ver secção 2.16.2.). Ainda assim, o resultado da sequenciação do clone pIC111-V::ORF1 – 13 revelou-se inconclusivo, mesmo após várias tentativas de sequenciação com diferentes

3. Resultados

primers, entre os quais F12, R0 e NeginF. Relativamente aos resultados de sequenciação dos clones recombinantes com o fragmento codificado pela ORF2 (pIC111-V::ORF2 – 5 e 7), foi possível detetar que a anotação da sequência que codifica para a proteína (ORF2) estava incorreta (início incorretamente assinalado), conduzindo à inserção prematura de um codão de terminação da tradução localizado, aproximadamente, cinquenta nucleótidos a montante do real início da sequência codificante pretendida. Quanto à sequenciação dos clones recombinantes com o fragmento codificando a ORF3, os resultados revelaram a inserção de um nucleótido logo depois da extremidade 3' do *primer* reverso, provocando a alteração da grelha de leitura, e desfasando a fusão entre a ORF3 e a EGFP. Devido a estes resultados, a tentativa de construção de plasmídeos de expressão ficou comprometida.

4|

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

4. Discussão e Conclusões

4.1. Identificação de negevírus em mosquitos colhidos no sul de Portugal

Descrito pela primeira vez em 2013, o género *Negevirus* foi tentativamente proposto como um novo grupo taxonómico de vírus específicos de insetos, com uma ampla distribuição geográfica e diversidade de hospedeiros, entre os quais flebótomos e mosquitos (Vasilakis *et al.*, 2013). O interesse crescente sobre este novo género tem levado a que várias equipas de investigação se debrucem sobre o seu estudo, contribuindo para o aumento do número de trabalhos sobre eles publicados. Os primeiros negevírus descritos foram isolados de flebótomos do género *Lutzomyia* e de mosquitos dos géneros *Anopheles*, *Culex* e *Armigeres* capturados na América do Norte e do Sul, África e Ásia (Vasilakis *et al.*, 2013; Nabeshima *et al.*, 2014; Auguste *et al.*, 2014). Em Portugal, um estudo efetuado por Ferreira *et al.* (2013) no laboratório de Virologia do IHMT, permitiu igualmente isolar negevírus de mosquitos da espécie *Oc. caspius*, enquanto que, mais recentemente, foram encontrados negevírus em mosquitos de géneros diferentes dos até então descritos, incluindo *Aedes*, *Mansonia*, *Psorophora* e *Wyeomyia*, mas também *Trichoprosopon*, *Toxorhynchites* e *Coquillettidia* (Kallies *et al.*, 2014), comprovando, efetivamente, que o género *Negevirus* possui uma ampla diversidade de hospedeiros.

Um dos objetivos deste trabalho consistiu na identificação de negevírus, em mosquitos de diferentes espécies capturados no sul de Portugal, confirmando deste modo a expansão da diversidade de hospedeiros já conhecida do género *Negevirus*. No total foram analisados 2.586 mosquitos, distribuídos por 56 lotes e 10 espécies distintas: *Oc. caspius* (n=17), *Cx. theileri* (n=15), *Cx. pipiens* (n=9), *An. atroparvus* (n=6), *Cx. univittatus* (n=3), *Cx. lactincintus* (n=2), *An. algeriensis* (n=1), *Cu. annulata* (n=1), *Cu. longiareolata* (n=1) e *Ae. detritus* (n=1). Após o rastreio de genomas virais, o qual se baseou na tentativa de amplificação de sequências genómicas a partir de cDNA produzido de RNA total extraído de macerados de mosquitos fêmeas (adultos), foi possível identificar a presença de genomas de negevírus em 9 dos 56 lotes de mosquitos analisados (aproximadamente 16 % das amostras) e dos quais constavam as espécies *Oc. caspius*, *Cx. pipiens*, *Cx. theileri* e *Cx. univittatus* (4 em 10 espécies estudadas). Estes resultados traduziram-se em taxas de infeção mínima (MIR do inglês *Minimum Infection Rate*) de, aproximadamente, 3,68, 4,45, 1,38 e 9,62 para lotes das espécies *Oc. caspius*, *Cx. pipiens*, *Cx. theileri* e *Cx. univittatus*, respetivamente.

A maioria dos produtos de amplificação obtidos, sugestivos de corresponderem a sequências virais, resultaram da amplificação com os pares de *primers* desenhados para permitirem (tanto quanto possível) amplificar sequências de vírus Negev, Piura, Ngewotan, e/ou de vírus geneticamente semelhantes a estes, tal como se verificou após a análise dos extratos de RNA preparados a partir dos macerados de mosquitos das espécies *Oc. caspius* (183, 390 e 539), *Cx. pipiens* (204 e 292) e *Cx. univittatus* (730) (Figuras 9 e 10). De acordo com os dados publicados por Vasilakis *et al.* (2013), os vírus de tipo Negev (vírus pertencentes à mesma linhagem genética que inclui as estirpes virais encontradas em mosquitos colhidos em Israel, incluindo as estirpes de referência Negev EO-329, Negev M30957 e Negev M33056) representam, aparentemente, os negevírus com maior distribuição geográfica, motivo que pode justificar o resultado obtido. Embora o extrato de cDNA preparado a partir do macerado de *Oc. caspius* (390) tenha revelado também a presença de produtos de amplificação, aparentemente específica, como consequência da utilização, nas reações de RT-PCR de *primers* que deveriam permitir amplificar sequências de vírus Loreto e/ou vírus semelhantes a este (Figura 11), tal facto pode ser explicado pelas características pouco restritivas das condições de PCR, e relativa conservação da sequência do gene-alvo, utilizados. O facto da região que codifica a RdRp viral, cuja sequência codificante foi tentativamente amplificada durante o rastreio efetuado, ser uma região relativamente conservada entre o genoma de todos os vírus, mesmo dos mais diferentes entre si do ponto de vista genético, não excluiu a possibilidade de amplificação, pelo menos em alguns extratos, de sequências virais, especialmente quando são utilizados, nas reações de PCR, perfis térmicos pouco restritivos. Se, por um lado, tal permite justificar alguns dos produtos de amplificação obtidos, não deixa de ser inesperado o facto de que o extrato de cDNA preparado a partir de RNA extraído do macerado de *Cx. theileri* (392) tenha evidenciado a presença de um produto de amplificação (Figura 12) obtido, exclusivamente, com o par de *primers* que permitiam amplificar sequências do genoma de vírus Santana e Dezidougou e/ou vírus semelhantes a estes.

Apesar do rastreio realizado ter permitido a observação de diversos produtos de amplificação, sugestivos de corresponderem a sequências virais, com base na utilização de vários dos extratos de cDNA preparados, foi igualmente possível observar a presença de variados produtos de amplificação não específica. A sua origem pode ser muito

4. Discussão e Conclusões

diversa. Nesse sentido, é importante reconhecer que os extratos de RNA utilizados não eram puros, na medida em que resultaram de uma extração de RNA a partir de cada um dos macerados de mosquitos. Como tal, para além de poderem conter moléculas de RNA dos mosquitos e de eventuais genomas virais, como se veio a constatar, poderiam conter RNA com origem nos genomas de seres endossimbiontes (ou outras bactérias), fungos ou ectoparasitas que infetam os próprios mosquitos. A complexidade da amostra de partida e as temperaturas de hibridação relativamente baixas usadas nos protocolos de amplificação podem, assim, ter justificado a presença de alguns dos produtos de amplificação não específica observados. Além disso, é igualmente de salientar que vários dos *primers* utilizados no rastreio tinham características degeneradas, de forma a permitirem amplificar sequências conservadas da RdRp de um maior número de potenciais negevírus presentes nos extratos analisados. Apesar de ser uma estratégia aparentemente vantajosa, pode ser arriscada na medida em que normalmente, e tal como referido, exige a utilização de protocolos de amplificação com temperaturas de hibridação menos restritivas, diminuindo a especificidade da amplificação conseguida.

É igualmente importante ter em consideração a possível presença de elementos virais endógenos, designados EVE (do inglês *Endogenous Viral Elements*) integrados no genoma de insetos aquando a realização deste tipo de rastreio. EVE derivados de vírus de RNA foram descritos pela primeira vez por Crochu *et al.* (2004), referindo-se à integração de fragmentos de sequências homólogas às do flavivírus CFAV no genoma de mosquitos *Aedes* spp. Desde então têm sido identificados vários EVE, derivados de vírus de RNA de diversas famílias, integrados no genoma de diversos insetos e de plantas de várias espécies (Holmes, 2011). Um estudo efetuado recentemente evidenciou a presença de EVE, aparentemente semelhantes às sequências de vírus de plantas com genoma de ssRNA⁺, no genoma de vários insetos, incluindo moscas-da-fruta (*Drosophila rhopaloea*, *D. ananassae* e *D. ficusphila*), abelhas (*Bombus terrestris*, *B. impatiens* e *Megachile rotundata*), formigas (*Pogonomyrmex barbatus*) bichos-da-seda (*Bombyx mori*), vespas (*Nasonia vitripennis*, *N. longicornis*, e *N. giraulti*), borboletas (*Danaus plexippus*), pulgões (*Acyrtosiphon pisum*) e mosquitos (*Ae. aegypti*), correspondendo estas, a sequências codificantes de proteínas homólogas à RdRp de vírus semelhantes aos negevírus no genoma de variados insetos (Cui e

Holmes, 2012). Ainda que a pesquisa destas sequências integradas no genoma das espécies rastreadas não tenha sido efetuada, é possível antecipar que, caso existam e sejam transcritas (ou permaneçam sob a forma de contaminações residuais de fragmentos de DNA nos extratos de RNA preparados), alguns dos produtos de amplificação obtidos possam, efetivamente, ter resultado da amplificação de sequências destes EVE. Neste sentido, o rastreio efetuado foi assumido como indicativo, ou não, da presença de negevírus nas espécies analisadas, sendo que um dos objetivos propostos neste trabalho consistiu no isolamento dos vírus em questão, como forma de confirmar que os produtos de amplificação específica obtidos durante o rastreio resultaram, efetivamente, da amplificação de sequências de RNA de origem viral.

O isolamento de presumíveis negevírus em culturas de células de inseto da linha celular C6/36 permitiu confirmar a presença destes nos lotes de macerados, como resultado da deteção de genomas virais a partir de RNA extraído, diretamente, dos sobrenadantes de cultura obtidos. Tendo em consideração que a exposição direta das células em cultura a alíquotas dos macerados de mosquitos utilizados poderia provocar um CPE indesejado (resultante da citotoxicidade de alguns dos componentes do macerado, e não, necessariamente, devido à replicação viral), foram efetuadas duas passagens cegas, com intervalos de 96 horas, as quais contribuíram, igualmente, para amplificar o título viral. A análise por microscopia ótica de culturas de células C6/36 potencialmente infetadas revelou a presença de CPE óbvio 24-48 horas após o início da infeção, caracterizado essencialmente pela desagregação das células da monocamada com destacamento do suporte físico, e subsequente diminuição do tamanho e arredondamento das células em cultura (Figura 15). O CPE observado foi muito semelhante ao descrito anteriormente por Ferreira *et al.* (2013) como sendo sugestivo da replicação de negevírus. A deteção de genomas de negevírus nos sobrenadantes de cultura foi efetuada através da amplificação específica de sequências virais, sugestivas de corresponderem a sequências de negevírus de tipo Negev, Ngewotan, Piura e/ou de vírus semelhantes a estes. Curiosamente, nenhum dos sobrenadantes de cultura rastreados foi sugestivo de conter vírus Loreto, Dezidougou, Santana e/ou de vírus semelhantes a estes. Este facto reforça a possibilidade do fragmento de DNA observado após a análise do extrato de cDNA preparado a partir do macerado do lote de *Oc. caspius* (390), ter sido amplificado a partir do genoma de um negevírus de tipo Negev, e

4. Discussão e Conclusões

não de um vírus Loreto. Quanto ao macerado de *Cx. theileri* (392), inicialmente sugestivo da presença de sequências de negevírus de tipo Santana e Dezidougou, revelou a presença de genomas virais de tipo Negev no sobrenadante de cultura obtido após isolamento. Este resultado, aparentemente contraditório do indicado pelo rastreio efetuado, pode ser justificável na medida em que o extrato de RNA obtido a partir do sobrenadante de cultura possui uma menor complexidade comparativamente ao extrato de RNA obtido a partir dos macerados de mosquitos.

Aquando a tentativa de isolamento de presumíveis vírus em cultura, é importante ter ainda em consideração que esta técnica, por si só, pode introduzir vieses ao isolamento devido à possibilidade de ocorrência de efeito de funil (em inglês *bottleneck*). Este tipo de fenómeno caracteriza-se pela possibilidade de vírus poderem estar efetivamente presentes nos macerados em análise, mas não ser possível isolá-los em cultura. No entanto, se por um lado é formalmente provável que só tenha sido possível isolar parte dos eventuais vírus de insetos inicialmente presentes nas amostras em estudo (ver abaixo), os resultados demonstrados neste trabalho permitiram, inequivocamente, isolar várias estirpes de negevírus, reforçando também o facto das células C6/36 serem muito permissivas à replicação viral, e por isso constituírem um sistema celular de referência tendo em vista o isolamento de vírus de insetos.

Análises anteriores permitiram constatar a presença de mais do que um vírus em sobrenadantes de culturas expostas a alguns macerados de *Oc. caspius*, enquanto que noutros foi apenas detetada a presença de ISF, mais concretamente OCFV_{PT} (Ferreira *et al.*, 2013). No decurso deste trabalho foi igualmente possível coisolar negevírus e flavivírus em dois macerados de *Oc. caspius* (183 e 539), devido à amplificação de sequências virais de ambos os vírus presentes nos sobrenadantes de cultura após isolamento. Além disso, foi igualmente possível confirmar a presença exclusiva de OCFV_{PT} (ou um flavivírus com sequências codificantes de uma RdRp muito semelhante a este) no sobrenadante de cultura obtido após isolamento com origem no lote de *Oc. caspius* (595) (Ferreira *et al.*, 2013). Tal facto foi revelado não só pela presença de produtos de amplificação específica correspondentes exclusivamente a sequências do genoma de flavivírus, mas também devido à ausência dos CPE exuberantes patentes nas culturas de células C6/36 infetadas com a maioria dos negevírus. Por oposição a estes, as células infetadas com OCFV_{PT} revelam, essencialmente, paragem do seu crescimento

e formação de alguns agregados. Estes resultados seriam de antecipar dado que o OCFV_{PT} foi descrito como sendo geneticamente muito semelhante ao HANKV (Huhtamo *et al.*, 2012) e, consequentemente, pouco citopático.

Se, por um lado, a utilização de sistemas celulares pode introduzir eventuais enviesamentos no tipo de vírus isolados a partir de misturas, também é um facto que apesar do rastreio efetuado nos sobrenadantes de cultura ter permitido apenas a deteção de genomas de negevírus e flavivírus não exclui a possibilidade de outros vírus poderem estar presentes nos sobrenadantes analisados, os quais não foram contemplados no rastreio efetuado. É importante salientar que rastreios de sequências virais efetuados com recurso à produção de macerados de mosquitos (tal como foi utilizado no decurso deste trabalho) em detrimento do uso de mosquitos de forma individualizada, se por um lado permitem a análise de um grande número de espécimes, por outro, caso sejam isoladas múltiplas estirpes virais a partir da mesma fonte, não permitem afirmar se os vírus coisolados provêm de um mesmo espécime (verdadeiras coinfeções) ou de indivíduos diferentes. Neste sentido, teria sido vantajoso identificar a presença de coinfeções, especialmente porque recentemente estudos têm demonstrado que a coinfeção de mosquitos com flavivírus específicos de insetos pode potenciar, ou suprimir, a transmissão de flavivírus patogénicos transmitidos por mosquitos (Bolling *et al.*, 2012; Hobson-Peters *et al.*, 2013; Kenney *et al.*, 2014; Kent *et al.*, 2010). Assim sendo, até que ponto é que a presença de negevírus em mosquitos altera a sua capacidade de servirem de vetores ou simples hospedeiros a outros vírus é uma questão que deverá ser abordada no futuro.

Inicialmente, o género *Negevirus* foi descrito como sendo constituído por seis linhagens virais distintas designadas de Negev, Ngewotan, Piura, Loreto, Dezidougou e Santana, distribuídas por três grupos monofiléticos principais partilhando um ancestral comum (Vasilakis *et al.*, 2013). Recentemente, foi proposta uma nova divisão deste *taxon*, baseada em análises filogenéticas de sequências proteicas (domínio RdRp), de genomas de todos os negevírus descritos até à data, a qual evidencia a divisão do género *Negevirus* em dois grupos monofiléticos principais, os quais foram tentativamente denominados de *Sandewavirus* e *Nelorpivirus* (Kallies *et al.*, 2014). No decurso do trabalho aqui apresentado, análises filogenéticas efetuadas com base no alinhamento de parte das sequências nucleotídicas codificantes da RdRp da ORF1 viral permitiram

4. Discussão e Conclusões

identificar a ocorrência de uma linhagem genética, filogeneticamente próxima do grupo monofilético constituído pelos vírus Negev EO-329, Negev M30957 e Negev M33056 isolados de mosquitos das espécies *An. coustani*, *Cx. coronator* e *Cx. quinquefasciatus*, respetivamente, capturados em Israel e nos Estados Unidos da América (Vasilakis *et al.*, 2013) (Figura 17A). Deste novo grupo monofilético fazia parte a maioria das sequências dos negevírus em análise, isolados de mosquitos das espécies *Oc. caspius*, *Cx. theileri* e *Cx. pipiens*, incluindo a sequência do vírus OCNV₁₇₄, isolado anteriormente de *Oc. caspius* (Ferreira *et al.*, 2013). Por sua vez, o referido grupo evidenciou estar subdividido em dois subgrupos, divisão essa que, aparentemente, revelou poder estar relacionada com a espécie de mosquitos de onde foram isolados os negevírus em estudo, visto que num constavam sequências de negevírus, maioritariamente isolados de *Oc. caspius* e noutro, sequências de negevírus, maioritariamente isolados de *Cx. pipiens* (Figura 17B). Curiosamente, apenas uma sequência analisada, referente ao genoma de um negevírus, isolado de mosquitos *Cx. univittatus*, revelou não fazer parte do novo grupo monofilético identificado, mas sim constituir um outro subgrupo, filogeneticamente bem suportado com valores de *bootstrap* superiores a 90 %, com o vírus Negev EO-329, isolado de *An. coustani* (Figura 18). O facto de negevírus tão próximos filogeneticamente terem sido isolados de mosquitos hospedeiros tão distintos, como *Cx. univittatus* e *An. coustani*, os quais nem pertencem sequer ao mesmo género e em locais tão longínquos como Portugal e Israel, reforça, mais uma vez, a ideia da ampla distribuição geográfica e de hospedeiros do género *Negevirus*.

Embora a tentativa de identificação de presumíveis genomas de negevírus em mosquitos capturados no sul de Portugal tenha seguido uma abordagem qualitativa, na medida em que se pretendia somente avaliar a presença ou ausência de genomas virais e associá-los a novas espécies de mosquitos hospedeiros, sem contemplar eventuais predomínios por determinadas espécies ou regiões, verificou-se uma distribuição equilibrada de negevírus ao longo das três regiões do Algarve em análise. Isto é, não foi possível identificar uma região na qual não tivessem sido detetados mosquitos com negevírus, tendo sido possível detetar genomas virais num lote de mosquitos *Oc. caspius* (183) capturados na região oeste do Algarve, compreendida aproximadamente entre Lagos e Albufeira, um lote de mosquitos *Cx. pipiens* (204) na região centro, aproximadamente entre Loulé e Olhão, quatro lotes de mosquitos das espécies *Oc.*

caspius (390 e 539), *Cx. theileri* (392) e *Cx. pipiens* (292) na região este, aproximadamente entre Tavira e Vila-Real de Santo António e um lote de mosquitos, da espécie *Cx. univittatus* (730) capturados ao longo das três regiões (Figura 13). Mais uma vez, estes dados sugeriram que o género *Negevirus* possui, efetivamente, uma ampla distribuição, mesmo em áreas geográficas menores.

A presença e alta prevalência de mosquitos *Oc. caspius* e *Cx. theileri* em detrimento de outras espécies nas regiões costeiras do sul, como o distrito de Faro, seria de antecipar, tendo em conta os levantamentos entomológicos efetuados recentemente (Almeida *et al.*, 2008; Osório *et al.*, 2010). Por essa razão, o número total de lotes de mosquitos da espécie *Oc. caspius* analisados foi o maior, correspondendo a aproximadamente 30 % dos lotes analisados (17 em 56 lotes), seguindo-se os lotes de mosquitos da espécie *Cx. theileri*, correspondente a aproximadamente 27 % dos lotes (15 em 56 lotes). Embora tenha sido possível detetar a presença de negevírus em mosquitos da espécie *Oc. caspius* e *Cx. pipiens* é impossível estabelecer uma relação entre o predomínio da presença de negevírus nessas espécies, em detrimento de outras, visto que este resultado pode estar enviesado devido ao local de captura dos mosquitos analisados. Por este motivo, a avaliação quantitativa paralelamente à avaliação qualitativa efetuada teria sido uma vantagem na expansão do conhecimento sobre os hospedeiros dos negevírus. Além disso, teria sido igualmente interessante estender o estudo da gama de hospedeiros de negevírus aos flebótomos, não só pelo facto de já terem sido descritos como seus hospedeiros (Vasilakis *et al.*, 2013), mas também porque Portugal é um país com zonas ricas em flebótomos, entre as quais a região do Algarve (Schrey *et al.*, 1989; Alves-Pires *et al.*, 2001).

4.2. Análise da replicação de negevírus: OCNV₁₇₄ como modelo de estudo

O primeiro negevírus descrito em Portugal, denominado OCNV₁₇₄, foi obtido no laboratório de Virologia do IHMT e coisolado com OCFV_{PT} a partir de um macerado de *Oc. caspius* (Ferreira *et al.*, 2013). Após o isolamento viral em culturas de células C6/36, ambos os genomas virais foram detetados no sobrenadante de cultura com diferentes títulos virais, razão pela qual foi possível eliminar, por diluição limite, o

4. Discussão e Conclusões

OCFV_{PT}, mantendo o OCNV₁₇₄ e estudar as características da replicação viral em células C6/36, de forma particular.

A análise por microscopia ótica de culturas de células infetadas com OCNV₁₇₄ revelou a presença de um CPE com desenvolvimento muito rápido, extenso e semelhante ao anteriormente descrito por Ferreira e colaboradores (2013). O CPE observado nas culturas celulares C6/36, igualmente patente após isolamento de negevírus presentes nos macerados de mosquitos rastreados (ver secção 4.1.), permitiu comprovar experimentalmente que o CPE exuberante anteriormente observado por Ferreira *et al.* (2013) em culturas celulares infetadas em simultâneo com OCNV₁₇₄ e OCFV_{PT} se devia, maioritariamente, à replicação do OCNV₁₇₄, o que seria de antecipar devido à proximidade filogenética do OCFV_{PT} com HANKV o que lhe atribuiria, tal como referido anteriormente, baixa virulência (Huhtamo *et al.*, 2012). A análise por TEM de secções finas de células C6/36 infetadas com OCNV₁₇₄ revelou, à semelhança dos resultados anteriormente obtidos por Ferreira *et al.* (2013), hiperplasia nuclear e a separação óbvia dos dois folhetos que formam a dupla membrana lipídica do invólucro nuclear, a qual se constatou ser preenchida pela acumulação de múltiplas vesículas associadas ao ER ou ao Golgi (Figura 20). Estes resultados traduziram observações bastante semelhantes aos ensaios efetuados por Vasilakis *et al.* (2013) e por Auguste *et al.* (2014), repetidamente caracterizadas pela expansão do espaço intersticial do invólucro nuclear, e consequente preenchimento com vesículas e estruturas tubulares de dimensão variável, composição e origem até agora desconhecidas. Porém, é de salientar que os ensaios efetuados por Vasilakis *et al.*, (2013) revelaram que nem todos os tipos de negevírus dão origem ao mesmo tipo de CPE, particularmente no que se refere ao alargamento do espaço intersticial do invólucro nuclear. Aparentemente, apenas os vírus de tipo Negev, Piura, Dezidougou e Ngewotan demonstraram provocar uma expansão do espaço intersticial aquando a infeção de células de mosquito C6/36. No caso em particular do OCNV₁₇₄, para além dos resultados anteriormente obtidos por Ferreira *et al.* (2013), seria de antecipar que a replicação deste vírus em células C6/36 provocasse a expansão do espaço intersticial do invólucro nuclear das mesmas, devido à proximidade filogenética com vírus de tipo Negev, Piura e Ngewotan. Embora grande número dos mosquitos colhidos na natureza seja portador de densovírus, vírus de DNA de replicação nuclear (família *Parvoviridae*), responsáveis por causarem diferenças

consideráveis nos fenótipos infecciosos de linhas celulares C6/36 (Paterson *et al.*, 2005), incluindo hipertrofia nuclear, (Jousset *et al.*, 2000), a possível associação da replicação dos mesmos ao CPE observado foi previamente rejeitada por Ferreira *et al.* (2013), razão pela qual a mesma hipótese foi igualmente rejeitada neste trabalho. Além disso, a replicação de densovírus dá origem, normalmente, a estruturas paracristalinas, resultantes da organização simétrica das cápsides virais em formação no núcleo, nunca tendo o invólucro nuclear registado alterações morfológicas em células infetadas com estes vírus (Fédière, 2000). No decurso deste trabalho não foi possível observar este tipo de estruturas paracristalinas no interior do núcleo de células C6/36 infetadas com OCNV₁₇₄.

A possibilidade de que as estruturas tubulares observadas por TEM pudessem resultar da polimerização de uma qualquer proteína viral foi tentativamente avaliada através da análise da expressão de proteínas solúveis virais durante a replicação do OCNV₁₇₄ em células C6/36. Tanto quanto a sensibilidade do método de SDS-PAGE permitiu constatar, não foi possível identificar bandas proteicas sugestivas de corresponderem a proteínas solúveis de origem viral em nenhum dos extratos preparados a partir de células recolhidas a diferentes tempos após a infeção (Figura 21).

Porém, é importante ter em consideração que a metodologia utilizada apresenta algumas limitações. Se, por um lado, as colorações efetuadas apenas permitem revelar componentes proteicos relativamente abundantes nos extratos analisados, por outro a separação das proteínas foi apenas unidimensional. Ou seja, as proteínas são separadas em função da sua massa molecular na presença de um campo elétrico, mas não é contemplada a possibilidade de distinguir diferentes proteínas com igual massa molecular mas sequências/características bioquímicas distintas. Desta forma, é impossível confirmar a ausência de proteínas solúveis de origem viral nos extratos analisados, dado poderem estar sobrepostas por proteínas de origem celular. Uma das formas de contornar esta limitação seria optar por efetuar uma eletroforese bidimensional, desenvolvida pela primeira vez em 1975 por O'Farrell e Klose (O'Farrell, 1975; Klose, 1975), em que a separação das proteínas é efetuada pela combinação de dois processos distintos, separação por focagem do ponto isoelétrico, seguida de separação em função da massa molecular. O recurso à radioatividade e a

4. Discussão e Conclusões

utilização de isótopos marcados² seria também uma alternativa para a pesquisa de eventuais proteínas de origem viral.

De acordo com os dados publicados por Vasilakis *et al.* (2013), os negevírus têm a capacidade de replicar rapidamente em células C6/36, aparentemente atingindo a estabilização do número de genomas virais no sobrenadante de cultura ao fim de 12 horas após a infeção. A rapidez da replicação de negevírus foi igualmente descrita por Gorchakov *et al.* (2014), embora utilizando um sistema analítico distinto, baseado em infeções iniciadas por transfecção de RNA viral, obtido *in vitro*, a partir de um clone genómico de origem num plasmídeo. Neste caso, a cinética de replicação viral em culturas de células C7/10 (igualmente derivadas de *Ae. albopictus*) revelou um aumento acentuado do título viral até 8 horas pós-transfecção, tendendo a estabilizar posteriormente até às 24 horas. No decurso do trabalho realizado, ensaios de RT-PCR convencional e em tempo real foram efetuados a partir de uma cinética de infeção de células C6/36 com OCNV₁₇₄ e permitiram identificar a presença de genomas de negevírus nos sobrenadantes de cultura 3-4 horas após o início da infeção (Figura 23 e Tabela 2). Tendo em consideração que os negevírus possuem genoma de ssRNA⁺, sugerindo a utilização de intermediários de dsRNA durante a replicação viral, foi efetuado recentemente um estudo no laboratório de Virologia do IHMT, recorrendo a uma estratégia de RT-PCR e utilizando *primers* construídos com sequências *tag*, os quais permitiram efetuar uma determinação discriminatória das cadeias de RNA de polaridade negativa no interior das células (Carapeta *et al.*, dados por publicar).

De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que 3 horas após o início da infeção de células C6/36 com OCNV₁₇₄ já era possível detetar a presença de intermediários de dsRNA totalmente funcionais, revelados pela deteção da cadeia complementar negativa, acompanhada de um aumento substancial da quantidade de cadeias de RNA de polaridade positiva no interior das células. Estes dados, para além de serem concordantes com os resultados obtidos aqui apresentados, podem também representar um esclarecimento para o valor de *Ct* obtido por PCR em tempo real, ligeiramente inferior a 30, no extrato de cDNA preparado a partir do sobrenadante recolhido, precisamente, 3 horas após o início da infeção com OCNV₁₇₄ (Tabela 2).

² Esta técnica consiste na incorporação de isótopos marcados, paragem momentânea da tradução e observação do local onde estão a ser incorporados os isótopos, podendo corresponder a um local de maior predomínio de proteínas virais.

Embora a rápida replicação de negevírus em células C6/36, acompanhada de CPE extenso, poder conduzir as células infetadas à entrada em apoptose, esta não aparentou ser consequência direta a replicação viral. De facto, evidências da ocorrência de apoptose foram apenas detetadas 72 horas após o início da infeção de células C6/36 com OCNV₁₇₄, reveladas através da deteção de pequenas quantidades de produtos de degradação de DNA celular, os quais corresponderam, muito provavelmente, a fragmentos inter-nucleossómicos resultantes da clivagem de DNA genómico por nucleases (Figura 22). A exaustão metabólica das culturas celulares infetadas, a acumulação de proteínas virais no citoplasma e/ou a desagregação, por exemplo, do citoesqueleto, são também possíveis razões para a presença de produtos de degradação de DNA celular. Curiosamente, estas observações ficaram desfasadas do motivo que levaria a crer, antecipadamente, que a replicação destes vírus poderia conduzir à apoptose em células C6/36. De facto, dado o CPE registado após 48 horas de infeção (Figura 19B), seria expectável que, se estes vírus induzissem a apoptose das células durante a replicação de forma clara, fosse visível a presença de vários fragmentos inter-nucleossómicos, no momento em que a observação de culturas de células infetadas revelou CPE óbvios. No entanto, e tanto quanto a análise efetuada permitiu constatar, os efeitos decorrentes da entrada de algumas células em apoptose (entre as 48 e 72 horas após a infeção) parecem desfasados da replicação viral num momento em que os CPE registados se tinham, há mais de um dia, evidenciado como bastante exuberantes. Além disso, é importante salientar que as células apoptóticas têm tendência a sofrer deformações da membrana (do inglês *blebs*) que terminam na fragmentação das células em corpos apoptóticos (Coleman *et al.*, 2001), as quais não foram observadas por microscopia ótica.

4.3. Construção do vetor plasmídico pIC111-V para expressão constitutiva de proteínas em células de inseto

O vetor pIC111-V foi construído com o intuito de possibilitar construções subsequentes de plasmídeos dele derivados, destinados a permitirem a expressão constitutiva de proteínas em células de inseto. Além disso, a construção do referido vetor poderia igualmente representar uma ferramenta que permitiria ser usada como

4. Discussão e Conclusões

referência, tendo em vista o desenvolvimento de novas metodologias para ultrapassar as limitações dos processos de transfeção de células de inseto, sobejamente conhecidas, e associadas, sobretudo, à toxicidade dos reagentes de transfeção e complexidade de metodologias que se traduzem em eficiências de transfeção baixas e fraca reprodutibilidade dos resultados (Ogay *et al.*, 2006).

A avaliação da funcionalidade do pIC111-V foi efetuada mediante a análise da expressão proteica de EGFP por microscopia de fluorescência, após a transfeção de células de vertebrado e de inseto das linhas celulares HEK293T e C6/36, respetivamente. Células HEK293T transfetadas com pIC111 foram utilizadas como controlo positivo ao ensaio de transfeção, pelo facto do promotor CMV presente neste vetor, ser reconhecido em células de vertebrado, tendo estas revelado fluorescência com um nível de intensidade considerável (Figura 26B). Embora as condições do protocolo de transfeção utilizado tenham sido adaptadas de Dong *et al.* (2007), o mesmo protocolo tinha permitido a visualização de fluorescência extensa (e intensa) no decurso de um ensaio semelhante, realizado anteriormente no laboratório de Virologia do IHMT (Melo-Pimenta, 2013), razão pela qual, foi igualmente utilizado no decorrer do trabalho aqui apresentado.

Ainda que o vetor pIC111-V tenha sido corretamente construído, constatado pela confirmação da sua sequência nucleotídica, verificou-se que, na prática, a sua utilidade como veículo para a expressão de proteínas em células de vertebrado, aparentou estar comprometida. Apesar do resultado obtido exigir uma confirmação numa futura ocasião, foi possível verificar que após a transfeção de células HEK293T, a emissão de fluorescência por estas células foi praticamente nula (Figura 26C). Seria de antecipar que a intensidade da fluorescência emitida pelas células HEK293T transfetadas com este plasmídeo fosse semelhante à emitida por células transfetadas com o vetor pIC111, uma vez que o vetor pIC111-V foi construído de modo a manter o promotor CMV originário do vetor pIC111. Uma das razões que pode estar na origem dos resultados obtidos relaciona-se, diretamente, com a possibilidade da existência de erros associados ao ensaio de transfeção. Embora a transfeção de células HEK293T, quer com pIC111, quer com pIC111-V, tenha sido efetuada no mesmo dia e sob as mesmas condições, a reprodutibilidade do ensaio não foi, de facto, verificada. Por outro lado, este resultado pode também ser indicativo da possibilidade da presença de uma sequência de DNA

exógeno no vetor pIC111, neste caso o promotor OpIE1, poder perturbar a expressão proteica de EGFP em células HEK293T, possivelmente se a construção comprometer, por exemplo, i) a estabilidade do transcrito que codifica a EGFP ii) a sua taxa de tradução. A determinação comparativa do tempo de semivida dos transcritos EGFP-específicos obtidos a partir de pIC111 em células HEK293T poderia ser uma alternativa a obviar e esclarecer os resultados obtidos.

Células C6/36 transfetadas com pIC111, as quais serviram de controlo negativo do ensaio de transfeção desta linhagem celular, revelaram uma taxa de transcrição basal a partir do promotor CMV, traduzida num número muito limitado de células a expressar EGFP (Figura 26E). Este resultado seria de antecipar na medida em que o promotor CMV é dificilmente reconhecido em células de inseto (Wu *et al.*, 2000). O mesmo não se verificou nas células C6/36 transfetadas com pIC111-V dado ter sido possível verificar expressão de EGFP, demonstrando, aparentemente, o reconhecimento do promotor OpIE1 nestas células (Figura 26F). O facto do número de células com capacidade de expressar EGFP a partir do promotor OpIE1 ter sido relativamente baixo corroborou o facto das células C6/36 serem difíceis de transfetar (Ogay *et al.*, 2006).

Os principais objetivos decorrentes da tentativa de construção de plasmídeos de expressão de algumas proteínas codificadas pelo OCNV₁₇₄ em células eucariontes, consistiram em i) avaliar a possibilidade de mimetizar os CPE, ou parte deles, observados no decurso da replicação de negevírus, mediante a expressão transitória de proteínas virais, em particular as proteínas codificadas pelos domínios da ORF2 e ORF3 e ii) localizar os complexos replicativos nas células infetadas através da deteção da polimerase viral. Porém, e neste caso em particular, é de salientar que o sistema utilizado poderia não permitir revelar a verdadeira localização da RdRp, especialmente no caso da sua localização nas células, depender da sua interação com as demais proteínas virais.

Embora a concretização da construção dos referidos plasmídeos não tenha sido possível, é importante ter em consideração várias das limitações inerentes à realização do ensaio. Uma das limitações relacionou-se com a baixa taxa de sucesso obtido no processo de clonagem para a construção do plasmídeo de expressão da proteína de fusão RdRp-EGFP. Se por um lado o resultado da sequenciação revelou ser inconclusivo (antecipando, provavelmente, rearranjos estruturais que teriam limitado a capacidade de

4. Discussão e Conclusões

hibridação dos *primers* utilizados na determinação de parte da sua sequência), por outro, a obtenção de apenas um clone potencialmente recombinante já antecipava a possibilidade da tentativa de clonagem não ter sido bem-sucedida. É igualmente importante ter em consideração que a utilização de sistemas de clonagem, uma vez que são dependentes de sistemas vivos (neste caso bactérias *E. coli* da estirpe *NovaBlue*), apresenta limitações que não são passíveis de antecipar na sua totalidade. Ou seja, se o produto de expressão pretendido constituir de alguma forma um produto tóxico para as bactérias, comprometendo inclusivamente a sua sobrevivência, o mais provável é que estas não permitam a estabilização do inserto tentativamente clonado nos vetores de expressão pretendidos. Uma das formas para solucionar este problema poderia passar pela utilização de bactérias de *E. coli* de outra estirpe ou, em alternativa, tentar estabilizar o vetor no interior das células competentes através da diminuição da temperatura de incubação das mesmas ou da utilização de meios de cultura menos ricos, levando a uma expressão mais lenta dos produtos sintetizados e contribuindo para a eventual diminuição do *stress* celular (Fakruddin *et al.*, 2013). A alternativa de optar por um sistema de expressão estável, envolvendo inserções no genoma celular, ao invés de um sistema de expressão transitória, não foi considerada no decorrer deste trabalho. Embora pudesse oferecer vantagens, na medida em que era possível estabilizar e integrar as sequências codificantes das proteínas a expressar no genoma do hospedeiro, acarretava dificuldades técnicas consideravelmente maiores na sua concretização.

Por outro lado, a incorreta anotação da sequência codificante de uma das proteínas pretendidas (fusão ORF2-EGFP) foi também uma das limitações inerentes à construção de um dos plasmídeos de expressão pretendidos e a qual, apesar de poder ter sido, não foi, infelizmente, antecipada. Somente após a análise detalhada dos resultados de sequenciação de dois clones recombinantes selecionados aleatoriamente foi possível verificar a inserção prematura de um codão de terminação da tradução a montante do início real da sequência codificante pretendida. Como tal, e uma vez que os *primers* utilizados nas reações de amplificação dos fragmentos a clonar foram desenhados de forma específica a partir das sequências de negevírus disponíveis para consulta pública, a incorreta anotação das mesmas levou ao comprometimento do ensaio desde o início.

Por último, apesar dos ensaios de clonagem terem sido efetuados sob condições rigorosas, entre as quais, a utilização de uma polimerase de DNA com uma elevada

capacidade de correção de provas no decurso das reações de amplificação de sequências virais, foi possível verificar, após a análise do resultado de sequenciação obtido para os clones recombinantes com o fragmento codificado pela ORF3, a inserção de um nucleótido logo depois da extremidade 3' do *primer* reverso, provocando a alteração da grelha de leitura. Teoricamente, este tipo de acontecimentos não seria de prever devido à baixa taxa de inserção de nucleótidos errados no decurso da polimerização de novas cadeias de DNA pela polimerase utilizada, mas não pode ser formalmente excluída como uma possibilidade. Além disso, e mais uma vez, é de lembrar que a utilização de sistemas vivos apresenta restrições práticas inerentes a qualquer ensaio deste tipo e as quais são difíceis de antecipar.

O desenvolvimento de sistemas baseados na utilização de culturas celulares permitiu revolucionar, consideravelmente, os estudos das interações entre mosquitos e arbovírus. Porém, a escolha da linhagem celular a utilizar tem também um papel fundamental no sucesso dos mesmos. No decurso deste trabalho foram utilizadas culturas de células C6/36, originárias de macerados de larvas *Ae. albopictus*, as quais se sabiam ser bastante permissivas à replicação viral, e especificamente à replicação de negevírus (Vasilakis *et al.*, 2013). Como tal, esta linha celular representa uma mais-valia para o estudo das estratégias replicativas dos vírus propostos neste trabalho. No entanto, sabe-se que embora os mosquitos usem o RNA de interferência (RNAi) como mecanismo de defesa contra as infeções virais, as células C6/36 possuem um RNAi disfuncional (Brackney *et al.*, 2010), colocando em causa a sua utilização enquanto modelo de estudo de interações entre mosquitos e os vírus que os infetam, na medida em que não refletem, exatamente, o que ocorre *in vivo*.

Ainda que as observações reveladas pela utilização de culturas de células C6/36 possam não traduzir, exatamente, o que ocorre *in vivo*, a rapidez e os elevados títulos virais de negevírus obtidos durante a replicação viral nestas células sugerem que, nos mosquitos possam ser igualmente atingidos títulos virais elevados, a não ser que o sistema imune inato dos insetos infetados na natureza consiga, de alguma forma, contrariar a replicação viral. O real impacto e a importância destes vírus no comportamento dos insetos infetados, tal como na fecundidade, fertilidade e sobrevivência dos mesmos, permanece igualmente por ser explorado, justificando a realização de estudos futuros nesta área.

4. Discussão e Conclusões

O facto do proposto género *Negevirus* ter sido descrito pela primeira vez em 2013 justifica que muito permanece por ser descoberto, apesar dos esforços efetuados no sentido de expandir o conhecimento sobre este novo género de vírus de insetos.

Apesar da transmissão vertical e/ou venérea destes vírus ter sido sugerida por Vasilakis *et al.* (2013) como forma de justificar a sua manutenção na natureza, esta hipótese permanece por confirmar, e justifica futuras investigações.

De acordo com os dados publicados por Vasilakis *et al.* (2013), a infeção de vetores antropofílicos tais como *Ae. albopictus* e *Ae. aegypti* com o vírus Negev EO-329, por um lado garantiu a sua infeção efetiva (através de um ensaio artificial baseado na infeção intratorácica destes mosquitos), por outro, permitiu constatar a possibilidade dos mosquitos utilizados poderem ser infetados através de uma refeição sanguínea, embora de forma pouco eficiente e dependente da utilização de uma suspensão viral com um título bastante elevado, entre 10^8 e 10^{10} p.f.u/mL, adicionado exogenamente à refeição administrada. Curiosamente, esta observação sugere outro tipo de considerações acerca da origem e evolução destes vírus. Devido à relação filogenética entre cilevírus e negevírus (Kallies *et al.*, 2014) é impossível eliminar a possibilidade dos negevírus serem, pelo menos na sua origem, vírus de plantas³. No entanto, embora a suscetibilidade da infeção de mosquitos com negevírus por via oral possa sugerir que os mosquitos tenham adquirido estes vírus a partir de uma fonte vegetal, provavelmente néctares, parece improvável que néctares florais ou sucos de frutas contivessem títulos virais consideravelmente elevados, capazes de conduzir à infeção dos insetos pela sua ingestão.

A forma como os negevírus replicam nos mosquitos é outra das áreas que requer maior atenção e que merece ser explorada. Enquanto o ciclo de transmissão biológica dos arbovírus inclui a sua disseminação pelos tecidos de um artrópode hematófago, e posterior infeção das glândulas salivares do mesmo de forma a suportar a transmissão do vírus para o hospedeiro vertebrado, a eventual possibilidade dos negevírus conseguirem igualmente disseminar-se pelo corpo dos insetos permanece por ser esclarecida.

³ Os genomas dos negevírus, aparentemente, não possuem genes que codificam proteínas de movimento (em inglês *movement proteins*) as quais são normalmente encontradas no genoma de vírus de plantas (Lucas, 2005), conferindo-lhes capacidade de mobilidade ao longo do corpo das plantas.

5 |

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

5. Referências Bibliográficas

Abd-Elsalam, K.A. (2003) Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design. *African Journal of Biotechnology*, 2 (5), pp. 91-95.

Ahlquist, P. (2006) Parallels among positive-strand RNA viruses, reverse-transcribing viruses and double-stranded RNA viruses. *Nature reviews. Microbiology*, 4 (5), pp. 371-382.

Allawi, H.T. and SantaLucia, J. (1998) Thermodynamics of internal C-T mismatches in DNA. *Nucleic Acids Research*, 26 (11), pp. 2694-2701.

Almeida, A.P.G., Galão, R.P., Sousa, C.A., Novo, M.T., Parreira, R., Pinto, J., Piedade, J. and Esteves, A. (2008) Potential mosquito vectors of arboviruses in Portugal: species, distribution, abundance and West Nile infection. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 102 (8), pp. 823-832.

Almeida, A.P.G., Freitas, F.B., Novo, M.T., Sousa, C.A., Rodrigues, J.C., Alves, R. and Esteves, A. (2010) Mosquito surveys and West Nile virus screening in two different areas of southern Portugal, 2004-2007. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 10 (7), pp. 673-680.

Almeida, A.P.G. (2011) Os mosquitos (Diptera, *Culicidae*) e a sua importância médica em Portugal – Desafios para o Século XXI. *Acta médica portuguesa*, 24 (6), pp. 961-974.

Alves-Pires, C., Campino, L., Afonso, M.O., Santos-Gomes, O., Dedet, J.P. and Pratlong, F. (2001) Les phlébotomes du Portugal X – Infestation naturelle de *Phlebotomus perniciosus* por *Leishmania infantum* MON-1 en Algarve. *Annales de Parasitologie humaine et Comparée*, 8, pp. 374-375.

Ambrose, H.E. and Clewley, J.P. (2006) Virus discovery by sequence-independent genome amplification. *Reviews in Medical Virology*, 16 (6), pp. 365-383.

Attoui, H., Jaafar, F.M., Belhouchet, M., Biagini, P., Cantaloube, J.F., Micco, P. and Lamballerie, X. (2005) Expansion of family Reoviridae to include nine-segmented

5. Referências Bibliográficas

dsRNA viruses: Isolation and characterization of a new virus designated aedes pseudoscutellaris reovirus assigned to a proposed genus (Dinovernavirus). *Virology*, 343 (2), pp. 212-223.

Auguste, A.J., Carrington, C.V., Forrester, N.L., Popov, V.L., Guzman, H., Widen, S.G., Wood, T.G., Weaver, S.C. and Tesh, R.B. (2014) Characterization of a novel *Negevirus* and a novel *Bunyavirus* isolated from *Culex* (*Culex*) *deklarator* mosquitoes in Trinidad. *The Journal of General Virology*, 95 (2), pp. 481-485.

Badurdeen S., Valladares D.B., Farrar, J., Gozzer, E., Kroeger, A., Kuswara, N., Ranzinger, S.R., Tihn, H.T., Leite, P., Mahendradhata, Y., Skewes, R. and Verrall, A. (2013) Sharing experiences: towards an evidence based model of dengue surveillance and outbreak response in Latin America and Asia. *BMC Public Health*, 13 (607), pp.1-14.

Baltimore, D. (1971) Expression of animal virus genomes. *Bacteriological Reviews*, 35 (3), pp. 235-241.

Bellini, R., Gelbic, I., Sánchez-Seco, M.P., Johnson, N. and Dottori, M. (2012) Detection of mosquito-only flavivirus in Europe. *The Journal of General Virology*, 93 (6), pp. 1215-1225.

Benedict, M.Q., Levine, R.S., Hawley, W.A. and Lounibos, L.P. (2007) Spread of the Tiger: Global Risk of Invasion by the Mosquito *Aedes albopictus*. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 7 (1), pp. 76-85.

Bolling, B.G., Eisen, L., Moore, C.G. and Blair, C.D. (2011) Insect-Specific Flaviviruses from *Culex* Mosquitoes in Colorado, with Evidence of Vertical Transmission. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 85 (1), pp. 169-177.

Bolling, B.G., Olea-Popelka F.J., Eisen, L., Moore, C.G. and Blair, C.D. (2012) Transmission dynamics of an insect-specific flavivirus in a naturally infected *Culex*

5. Referências Bibliográficas

pipiens laboratory colony and effects of co-infection on vector competence for West Nile virus. *Virology*, 427 (2), pp. 90-97.

Boon, J.A., Diaz, A. and Ahlquist, P. (2010) Cytoplasmic viral replication complexes. *Cell Host & Microbe*, 8 (1), pp. 77-85.

Brackney, D.E., Scott, J.C., Sagawa, F., Woodward, J.E., Miller, N.A., Schilkey, F.D., Mudge, J., Wilusz, J., Olson, K.E., Blair, C.D. and Ebel, G.D. (2010) C6/36 *Aedes albopictus* Cells Have a Dysfunctional Antiviral RNA Interference Response. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4 (10): e856.

Calheiros, J.M. (2006) Saúde Humana e Implicações para o Turismo. In: Santos F.D. and Miranda, P. (eds) *Alterações climáticas em Portugal Cenários, Impactos e medidas de adaptação – Projecto SIAM II*. First edition. Lisbon: Gradiva, pp. 233-270.

Calzolari, M., Zé-Zé, L., Ruzek, D., Vázquez, A., Jeffries, C., Defilippo, F., Osório, H.C., Kilian, P., Ruíz, S., Fooks, A.R., Maioli, G., Amaro, F., Tlustý, M., Figuerola, J., Medlock, J.M., Bonilauri, P., Alves, M.J., Sebesta, O., Tenorio, A., Vaux, A.G.C., Bellini, R., Gelbic, I., Sánchez-Seco, M.P., Johnson, N. and Dottori, M. (2012) Detection of mosquito-only flaviviruses in Europe. *The Journal of General Virology*, 93 (6), pp. 1215-1225.

Canuti, M. and Hoek, L. (2014) Virus discovery: are we scientists or genome collectors? *Trends in Microbiology*, 22 (5), pp. 229-231.

Cheeseman, I.M. and Desai, A. (2005) A Combined Approach for the Localization and Tandem Affinity Purification of Protein Complexes from Metazoans. *Science's STKE: signal transduction knowledge environment*, 2005 (266), pp. 1-15.

Chung, C.T., Niemela, S.L. and Miller, R.H. (1989) One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86 (7), pp. 2172-2175.

5. Referências Bibliográficas

- Coleman, M.L., Sahai, E.A., Yeo, M., Bosch, M., Dewar, A. and Olson, M.F. (2001) Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nature Cell Biology*, 3 (4), pp. 339-345.
- Cook, S., Moureau, G., Harbach, R.E., Mukwaya, L., Goodger, K., Ssenfuka, F., Gould, E., Holmes, E.C. and Lamballerie, X. (2009) Isolation of a novel species of flavivirus and a new strain of *Culex flavivirus* (*Flaviviridae*) from a natural mosquito population in Uganda. *The Journal of General Virology*, 90 (11), pp. 2669-2678.
- Cook, S., Moureau, G., Kitchen, A., Gould, E.A., Lamballerie, X., Holmes, E.C. and Harbach, R.E. (2012) Molecular evolution of the insect-specific flaviviruses. *The Journal of General Virology*, 93 (2), pp. 223-234.
- Costa, S.C.F. (2011) *FLAVIVIRUSES IN MOSQUITOES FROM SOUTHERN PORTUGAL, 2009-2010*. Tese de Mestrado. IHMT/UNL, Lisboa.
- Crabtree, M.B., Sang, R.C., Stollar, V., Dunster, L.M. and Miller, B.R. (2003) Genetic and phenotypic characterization of the newly described insect flavivirus, Kamiti River virus. *Archives of virology*, 148 (6), pp. 1095-1118.
- Crochu, S., Cook, S., Attoui, H., Charrel, R.N., De Chesse, R., Belhouchet, M., Lemasson, J.J., de Micco, P. and Lamballerie, X. (2004) Sequences of flavivirus-related RNA viruses persist in DNA form integrated in the genome of *Aedes* spp. mosquitoes. *The Journal of General Virology*, 85 (7), pp. 1971-1980.
- Cui, J. and Holmes, E.C. (2012) Endogenous RNA viruses of plants in insect genomes. *Virology*, 427 (2), pp. 77-79.
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R. and Posada, D. (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9 (8), p. 772.
- Denison, M.R. (2008) Seeking Membranes: Positive-Strand RNA Virus Replication Complexes. *PLoS Biology*, 6 (10): e270.

5. Referências Bibliográficas

Dilcher, M., Alves, M.J., Finkeisen, D., Hufert, F. and Weidmann, M. (2012) Genetic characterization of Bhanja virus and Palma virus, two tick-borne phleboviruses. *Virus Genes*, 45 (2), pp. 311-315.

Dong, W., Shufeng, L., Guanghui, J., Qiming, S., Dingyuan, M. and Zichun, H. (2007) Efficient Gene Transfection into Mammalian Cells Mediated by Polyethylenimine. *International Journal of Molecular Sciences*, 8 (2), pp. 81-102.

Evangelista, J., Cruz, C., Guevara, C., Astete, H., Carey, C., Kochel T.J., Morrison, A.C., Williams, M., Halsey, E.S. and Forshey, B.M. (2013) Characterization of a novel flavivirus isolated from *Culex (Melanoconion) ocoosa* mosquitoes from Iquitos, Peru. *The Journal of General Virology*, 94 (6), pp. 1266-1272.

Fakruddin, Md., Mazumdar, R.M., Mannan, K.S.B., Chowdhury, A. and Hossain, N. (2013) Critical Factors Affecting the Success of Cloning, Expression, and Mass Production of Enzymes by Recombinant *E. coli*. *Hindawi Publishing Corporation*, 2013, pp.1-7.

Fédière, G. (2000) Epidemiology and pathology of *Densovirinae*. *Contributions to Microbiology*, 4, pp. 1-11.

Ferreira, D.D., Cook, S., Lopes, Â., Matos, A.P., Esteves, A., Abecasis, A., Almeida, A.P., Piedade, J., and Parreira, R. (2013) Characterization of an insect-specific flavivirus (OCFV_{PT}) co-isolated from *Ochlerotatus caspius* collected in southern Portugal along with a putative new Negev-like vírus. *Virus Genes*, 47 (3), pp. 532-545.

Firth, C. and Lipkin, W.I. (2013) The genomics of emerging pathogens. *Annual review of genomics and human genetics*, 14, pp. 281-300.

Gorchakov, R.V., Tesh, R.B., Weaver, S.C. and Nasar, F. (2014) Generation of an infectious Negev virus cDNA clone. *The Journal of General Virology*, 95 (9), pp. 2071-2074.

5. Referências Bibliográficas

- Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, pp. 95-98.
- Hall, N. (2007) Advanced sequencing technologies and their wider impact in microbiology. *The Journal of Experimental Biology*, 210 (9), pp. 1518-1525.
- Hanahan, D. (1983) Studies on Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166 (4), pp. 557-580.
- Hobson-Peters, J., Yam, A.W., Lu, J.W., Setoh, Y. X., May, F.J., Kurucz, N., Walsh, S., Prow, N.A., Davis, S.S., Weir, R., Melville, L., Hunt, N., Webb, R.I., Blitvich, B.J., Whelan, P. and Hall, R.A. (2013) A New Insect-Specific Flavivirus from Northern Australia Suppresses Replication of West Nile Virus and Murray Valley Encephalitis Virus in Co-infected Mosquito Cells. *PLoS One*, 8 (2): e56534.
- Holmes, E.C. (2011) The evolution of endogenous viral elements. *Cell Host & Microbe*, 10 (4), pp. 368-377.
- Hoshino K., Isawa, H., Tsuda, Y., Sasaki, T., Yuda, M., Takasaki, T., Kobayashi, M. and Sawabe, K. (2007) Genetic characterization of a new insect flavivirus isolated from *Culex pipiens* in Japan. *Virology*, 359 (2), pp. 405-414.
- Huang, C., Slater, B., Campbell, W., Howard, J. and White, D. (2001) Detection of arboviral RNA directly from mosquito homogenates by reverse-transcription-polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods*, 94 (1-2), pp. 121-128.
- Hubálek, Z. (2008) Mosquito-borne viruses in Europe. *Parasitology Research*, 103 (1), pp. 29-43.
- Hubálek, Z., Rudolf, I. and Nowotny, N. (2014) Arboviruses Pathogenic for Domestic and Wild Animals. *Advances in Virus Research*, 89 (4), pp. 201-275.

5. Referências Bibliográficas

- Huhtamo, E., Putkuri, N., Kurkela, S., Manni, T., Vaheri, A., Vapalahti, O. and Uzcátegui, N.Y. (2009) Characterization of a novel flavivirus from mosquitoes in northern Europe that is related to mosquito-borne flaviviruses of the tropics. *Journal of Virology*, 83 (18), pp. 9532-9540.
- Huhtamo, E., Moureau, G., Cook, S., Julkunen, O., Putkuri, N., Kurkela, S., Uzcátegui, N.Y., Harbach, R.E., Gould, E.A., Vapalahti, O. and de Lamballerie, X. (2012) Novel insect-specific flavivirus isolated from northern Europe. *Virology*, 433 (2), pp. 471-478.
- Hulo, C., Castro, E., Masson, P., Bouqueleret, L., Bairoch, A., Xenarios, I. and Mercier, F. (2011) ViralZone: a knowledge resource to understand virus diversity. *Nucleic Acids Research*, 39 (1), pp. 576-582.
- Jousset, F.X., Baquerizo, E. and Bergoin, M. (2000) A new densovirus isolated from the mosquito *Culex pipiens* (Diptera: culicidae). *Virus Research*, 67 (1), pp. 11-16.
- Junglen, S., Kopp, A., Kurth, A., Pauli, G., Ellerbrok, H. and Leendertz, F.H. (2009) A New Flavivirus and a New Vector: Characterization of a Novel Flavivirus Isolated from *Uranotaenia* Mosquitoes from a Tropical Rain Fores. *Journal of Virology*, 83 (9) pp. 4462-4468.
- Junglen S. and Drosten, C. (2013) Virus discovery and recent insights into virus diversity in arthropods. *Current opinion in microbiology*, 16 (4), pp. 507-513.
- Kallies, R., Koop, A., Zirkel, F., Estrada, A., Gillespie, T.R., Drosten, C. and Junglen, S. (2014) Genetic characterization of goutanap virus, a novel virus related to negeviruses, cileviruses and higreviruses. *Viruses*, 6 (11), pp. 4346-4357.
- Katoh, K. and Toh, H. (2008) Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Briefings in Bioinformatics*, 9 (4), pp. 286-298.
- Kenney, J.L., Solberg, O.D., Langevin, S.A. and Brault, A.C. (2014) Characterization of a novel insect-specific flavivirus from Brazil: potential for inhibition of infection of

5. Referências Bibliográficas

arthropod cells with medically important flaviviruses. *The Journal of General Virology*, 95 (12) pp. 2796-2808.

Kent, R.J., Crabtree, M.B. and Miller, B.R. (2010) Transmission of West Nile virus by *Culex quinquefasciatus* say infected with Culex Flavivirus Izabal. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4 (5): e671.

Klose, J. (1975) Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humanenetik*, 26 (3), pp. 231-243.

Knoops, K., Kikkert, M., Worm, S.H., Zevenhoven-Dobbe, J.C., Meer, Y., Koster, A.J., Mommaas, A.M. and Snijder, E.J. (2008) SARS-coronavirus replication is supported by a reticulovesicular network of modified endoplasmic reticulum. *PLoS Biology*, 6 (9): e226.

Kopek, B.G., Perkins, G., Miller, D.J., Ellisman, M.H. and Ahlquist, P. (2007) Three-Dimensional Analysis of a Viral RNA Replication Complex Reveals a Virus-Induced Mini-Organelle. *PLoS Biology*, 5 (9): e220.

Kuno, G. (2007) Host range specificity of flaviviruses: correlation with *in vitro* replication. *Journal of Medical Entomology*, 44 (1), pp. 93-101.

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227 (5259), pp. 680-685.

Lauber, C., Ziebuhr, J., Junglen, S., Drosten, C., Zirkel, F., Nga, P.T., Morita, K., Snijder E.J. and Gorbalenya, A.E. (2012) Mesoniviridae: a proposed new family in the order *Nidovirales* formed by a single species of mosquito-borne viruses. *Archives of Virology*, 157(8), pp. 1623-1628.

Lourenço, J. and Recker, M. (2014) The 2012 Madeira Dengue Outbreak: Epidemiological Determinants and Future Epidemic Potential. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8 (8): e3083.

5. Referências Bibliográficas

Lucas, W.J. (2005) Plant viral movement proteins: agents for cell-to-cell trafficking of viral genomes. *Virology*, 344 (1), pp. 169-184.

Lundström, J.O. (1999) Mosquito-borne viruses in western Europe: a review. *Journal of Vector Ecology*, 24 (1), pp. 1-39.

Marklewitz, M., Handrick, S., Grasse, W., Kurth, A., Lukashev, A., Drosten, C., Ellerbrok, H., Leendertz, F.H., Pauli, G. and Junglen, S. (2011) Gouleako virus isolated from West African mosquitoes constitutes a proposed novel genus in the family *Bunyaviridae*. *Journal of Virology*, 85 (17), pp. 9227-9234.

Melo-Pimenta, A.I. (2013) Identificação da sequência de encapsidação do genoma do vírus Chikungunya (CHIKV). Tese de Mestrado. IHMT/UNL, Lisboa.

Miller, D.J. and Ahlquist, P. (2002) Flock house virus RNA polymerase is a transmembrane protein with amino-terminal sequences sufficient for mitochondrial localization and membrane insertion. *Journal of Virology*, 76 (19), pp. 9856-9867.

Miller, S. and Krijnse-Locker, J. (2008) Modification of intracellular membrane structures for virus replication. *Nature reviews. Microbiology*, 6 (5), pp. 363-374.

Mokili, J.L., Rohwer, F. and Dutih, D.E. (2012) Metagenomics and future perspectives in virus discovery. *Current opinion in microbiology*, 2 (1), pp. 63-77.

Nabeshima, T., Inoue, S., Okamoto, K., Posadas-Herrera, G., Yu, F., Uchida, L., Ichinose, A., Sakaguchi, M., Sunahara, T., Buerano, C., Tadena, F., Orbita, I., Natividad, F. and Morita, K. (2014) Tanay virus a new species of virus isolated from mosquitoes in the Philippines. *The Journal of General Virology*, 95 (6), pp. 1390-1395.

Nasar, F., Palacios, G., Gorchakov, R.V., Guzman, H., Rosa, A.P., Savji, N., Popov, V.L., Sherman, M.B., Lipkin, W.I., Tesh, R.B. and Weaver, S.C. (2012) Eilat virus, a unique alphavirus with host range restricted to insects by RNA replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109 (36), pp. 14622-14627.

5. Referências Bibliográficas

- Newhouse, V.R., Chamberlain, R.W., Johnston, J.F. and Sudia, W.D. (1966) Use of dry ice to increase mosquito catches of the CDC miniature light trap. *Mosquito News*, 26, pp. 30-35.
- Nga, P.T., Parquet, M.C., Lauber, C., Parida, M., Nabeshima, T., Yu, F., Thuy, N.T., Inoue, S., Ito, T., Okamoto, K., Ichinose, A., Snijder, E.J., Morita, K. and Gorbalenya, A.E. (2011) Discovery of the First Insect Nidovirus, a Missing Evolutionary Link in the Emergence of the Largest RNA Virus Genomes. *PLoS Pathogens*, 7 (9): e1002215.
- O'Farrel, P.H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 250 (10), pp. 4007-4021.
- Ogay, I.D., Lihoradova, O.A., Azimova, Sh.S., Abdukarimov, A.A., Slack, J.M. and Lynn, D.E. (2006) Transfection of insect cell lines using polyethylenimine. *Cytotechnology*, 51 (2), pp. 89-98.
- Oostra, M., Hagemeijer, M.C., Gent, M., Bekker, C.P., Lintelo, E.G., Rottier, P.J. and Haan, C.A. (2008) Topology and Membrane Anchoring of the Coronavirus Replication Complex: Not All Hydrophobic Domains of nsp3 and nsp6 Are Membrane Spanning. *Journal of Virology*, 82 (24), pp. 12392-12405.
- Osório, H.C., Amaro, F., Zé-Zé, L., Pardal, S., Mendes, L., Ventim, R., Ramos, J.A., Nunes, S. and Alves, M.J. (2010) Mosquito species distribution in mainland Portugal 2005-2008. *European Mosquito Bulletin*, 28 (10), pp. 187-193.
- Parreira, R., Cook, S., Lopes, Â., Matos, A.P., Almeida, A.P., Piedade, J. and Esteves, A. (2012) Genetic characterization of an insect-specific flavivirus isolated from *Culex theileri* mosquitoes collected in southern Portugal. *Virus Research*, 167 (2), pp. 152-161.
- Paterson, A., Robinson, E., Suchman, E., Afanasiev, B. and Carlson, J. (2005) Mosquito densovirus cause dramatically different infection phenotypes in the C6/36 *Aedes albopictus* cell line. *Virology*, 337 (2), pp. 253-261.

5. Referências Bibliográficas

Ribeiro, H. and Ramos, H.C. (1999) Identification keys of the mosquitoes of Continental Portugal, Açores and Madeira. *European Mosquito Bulletin*, 3, pp. 1-11.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74 (12), pp. 5463-5467.

Schrey, C.F., Pires, C.A. and Macvean, D.W. (1989) Distribution of phlebotomine sandflies and the rate of their infection with *Leishmania* promastigotes in the Algarve, Portugal. *Medical and Veterinary Entomology*, 3 (2), pp. 125-130.

Schwartz, M., Chen, J., Janda, M., Sullivan, M., Boon, J. and Ahlquist, P. (2002) A positive-strand RNA virus replication complex parallels form and function of retrovirus capsids. *Molecular Cell*, 9 (3), pp. 505-514.

Snow, K. and Ramsdale, C., 1999. Distribution chart for European mosquitoes. *European Mosquito Bulletin*, 3, pp. 14-31.

Stollar, V. and Thomas, V.L. (1975) An agent in the *Aedes aegypti* cell line (Peleg) which causes fusion of *Aedes albopictus* cells. *Virology*, 64 (2), pp. 367-377.

Straetemans, M. (2008) Vector-related risk mapping of the introduction and establishment of *Aedes albopictus* in Europe. *Euro Surveillance* 13 (7), pii=8040.

Sudia, W.D. and Chamberlain, R.W. (1962) Battery-operated light trap. An improved model. *Mosquito News*, 22, pp. 126-129.

Swei, A., Russell, B.J., Naccache, S.N., Kabre, B., Veeraraghavan, N., Pilgard, M.A., Johnson, B.J.B and Chiu, C.Y. (2013) The Genome Sequence of Lone Star Virus, a Highly Divergent Bunyavirus Found in the *Amblyomma americanum* Tick. *PLoS One*, 8 (4): e62083.

5. Referências Bibliográficas

- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S. (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28 (10), pp. 2731-2739.
- Vasilakis, N., Forrester, N.L., Palacios, G., Nasar, F., Savji, N., Rossi, S.L., Guzman, H., Wood, T.G., Popov, V., Gorchakov, R., González, A.V., Haddow, A.D., Watts, D.M., Rosa, A.P., Weaver, S.C., Lipkin, W.I. and Tesh, R.B. (2013) Negevirus: a Proposed New Taxon of Insect-Specific Viruses with Wide Geographic Distribution. *Journal of Virology*, 87 (5), pp. 2475-2488.
- Vázquez, A., Sánchez-Seco, M.P., Palacios, G., Molero, F., Reyes, N., Ruiz, S., Aranda, C., Marqués, E., Escosa, R., Moreno, J., Figuerola, J. and Tenorio, A. (2012) Novel flaviviruses detected in diferente species of mosquitoes in Spain. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 12 (3), pp. 223-229.
- Warrilow, D., Watterson, D., Hall, R.A., Davis, S.S., Weir, R., Kurucz, N., Whelan, P., Allcock, R., Hall-Mendelin, S., O'Brien, C.A. and Hobson-Peters, J. (2014) A New Species of Mesonivirus from the Northern Territory, Australia. *PLoS One*, 9 (3): e91103.
- Weaver, S.C. and Reisen, W.K. (2010) Present and Future Arboviral Threats. *Antiviral Research*, 85 (2), pp. 328-345.
- Welsch, S., Miller, S., Romero-Brey, I., Merz, A., Bleck, C.K., Walther, P., Fuller, S.D., Antony, C., Krijnse-Locker, J. and Bartenschlager, R. (2009) Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. *Cell Host & Microbe*, 5 (4), pp. 365-375.
- Wernike K., Jöst, H., Becker, N., Schmidt-Chanasit, J. and Beer, M. (2014) Lack of evidence for the presence of Schmallenberg virus in mosquitoes in Germany, 2011. *Parasites & Vectors*, 7 (402), pp. 1-6.

5. Referências Bibliográficas

Wu, T.Y., Liono, L., Chen, S.L., Chen, C.Y. and Chao, Y.C. (2000) Expression of highly controllable genes in insect cells using a modified tetracycline-regulated gene expression system. *Journal of Biotechnology*, 80 (1), pp. 75-83.

Zirkel, F., Kurth, A., Quan, P.L., Briese, T., Ellerbrok, H., Pauli, G., Leendertz, F.H., Lipkin, W.I., Ziebuhr, J., Drosten, C. and Junglen, S. (2011) An Insect Nidovirus Emerging from a Primary Tropical Rainforest. *mBio*, 2 (3): e00077-11.

6|

ANEXOS

Anexo 1 – Mapa físico e sequência parcial do vetor plasmídico pJet1.2/*blunt*

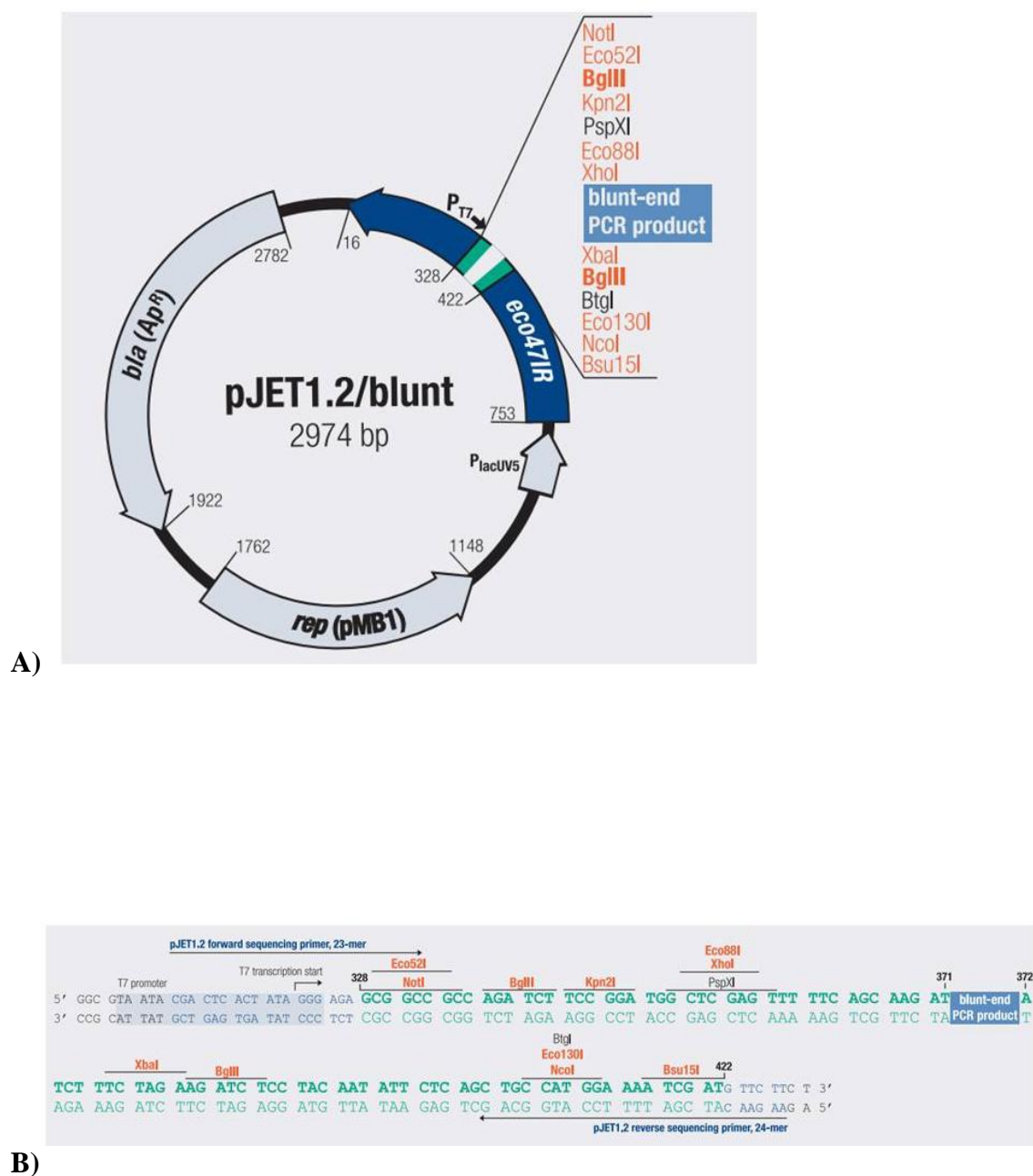


Figura A1 – Mapa físico do vetor plasmídico pJet1.2/*blunt* e representação dos respetivos MCS.
 (A) Mapa físico de pJet1.2/*blunt*: representação da localização do gene letal *eco47IR* e do gene *bla* o qual codifica para uma beta-lactamase que confere resistência à ampicilina. (B) Sequência da região MCS com representação dos locais de reconhecimento de endonucleases de restrição do tipo II. (Fonte: http://www.bioinfo.pt/hu/f2/pict_f2/pJETmap.pdf)

Anexo 2 – Mapa físico e sequência parcial do vetor plasmídico pIC111

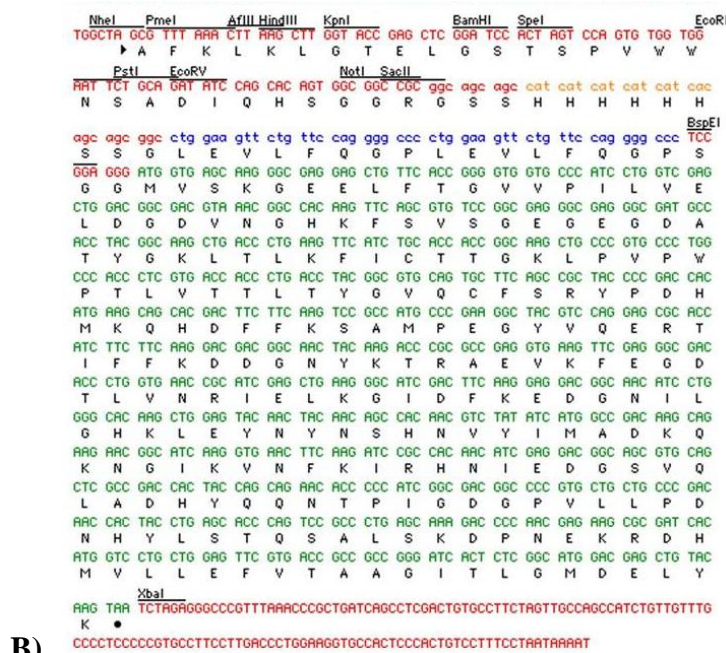
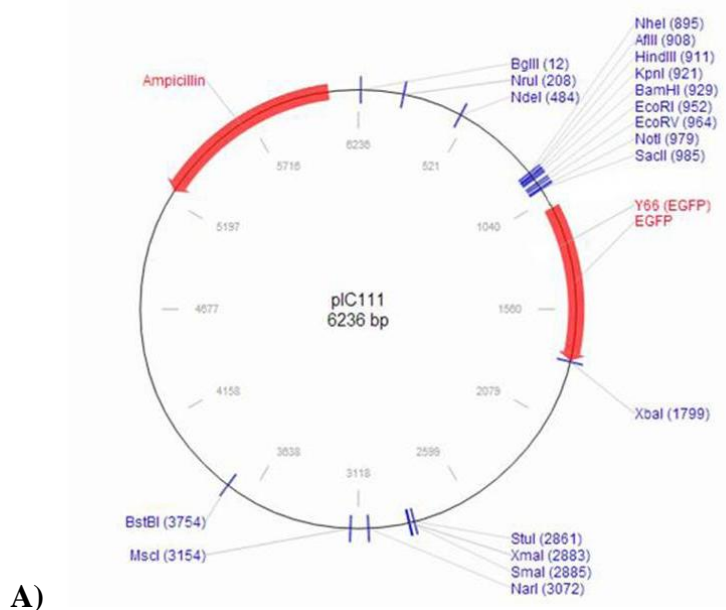


Figura A2 – Mapa físico e sequência parcial do vetor plasmídico pIC111.

(A) Mapa físico de pIC111; representação da localização dos genes que codificam a EGFP e que confere resistência à ampicilina (*bla*) aos clones que o transportam, bem como dos locais de reconhecimento de endonucleases de restrição do tipo II. (B) Representação de parte da sequência nucleotídica de pIC111: laranja, cauda 6x(His); azul, local de clivagem *PreScission* (2x); verde, gene *EGFP*; vermelho, sequências periféricas ao gene *EGFP*. Os locais de restrição são únicos no plasmídeo. [Fontes: <http://www.addgene.org/browse/sequence/60932/> (A); Cheeseman e Desai (2005) (B)].